

SÉRIE A, N° 643

N° D'ORDRE :

1383

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MAURICE PIETTRE

CHEF DE LABORATOIRE DU SERVICE VÉTÉRINAIRE SANITAIRE

DE LA VILLE DE PARIS ET DU DÉPARTEMENT DE LA SEINE

ATTACHÉ A L'INSTITUT PASTEUR

LAURÉAT DE L'INSTITUT

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA BILE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 juin 1910 devant la Commission d'examen

Président : M. G. BONNIER.

Examineurs { MM. DASTRE.
WALLERANT.

LAVAL

L. BARNEOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, Rue Ricordaine, 8

—
1910



SÉRIE A, N° 643
N° D'ORDRE :
1383

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MAURICE PIETTRE

CHEF DE LABORATOIRE DU SERVICE VÉTÉRINAIRE SANITAIRE
DE LA VILLE DE PARIS ET DU DÉPARTEMENT DE LA SEINE
ATTACHÉ A L'INSTITUT PASTEUR
LAURÉAT DE L'INSTITUT

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA BILE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 juin 1910 devant la Commission d'examen

Président : M. G. BONNIER.

Examineurs { MM. DASTRE.
WALLERANT.

LAVAL

L. BARNÉOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, Rue Ricordaine, 8

1910

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... P. APPELL, *Profess.* Mécanique rationnelle.

Doyen honoraire.... G. DARBOUX. — Géométrie supérieure

Profess. honoraires. { L. TROOST.
Ch. WOLF
J. RIBAN.

Professeurs..... { LIPPMANN Physique
BOUTY..... Physique.
BOUSSINESQ Phys.mathém. et calcul des probabilités
PICARD Analyse supér. et algèbre supérieure.
H. POINCARÉ..... Astronomie mathém. et mécan. céleste.
Y. DELAGE Zoologie, anatomie, physiologie compar.
G. BONNIER Botanique.
DASTRE Physiologie
KOENIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
VELAIN..... Géographie physique.
GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
CHATIN..... Histologie.
HALLER..... Chimie organique.
JOANNIS..... Chimie (Enseignement P. C. N.).
JANET..... Physique — —
WALLERANT..... Minéralogie.
ANDOYER..... Astronomie physique.
PAINLEVÉ..... Mathématiques générales.
HAUG Géologie.
TANNERY..... Calcul différentiel et calcul intégral.
RAFFY Application de l'analyse à la géométrie.
HOUSSAY Zoologie.
H. LE CHATELIER. Chimie.
G. BERTRAND..... Chimie biologique.
M^{me} P. CURIE..... Physique générale.
CAULLERY Zoologie (Évolution des êtres organisés)
C. CHABRIÉ..... Chimie appliquée.
G. URBAIN..... Chimie.
BOREL..... Théorie des fonctions.
MARCHIS Aviation.
JEAN PERRIN..... Chimie physique.
N..... Zoologie, anatomie, physiol. comparée.

Professeurs-adjoints. { PUISEUX Mécanique et Astronomie.
LEDUC..... Physique.
MATRUCHOT..... Botanique.
MICHEL Minéralogie.
G. PRUVOT..... Anatomie comparée.
HEROUARD..... Zoologie.
LÉON BERTRAND. Géologie.
RÉMY PERRIER..... Zoologie (Enseignement P. C. N.)
MOLLIARD..... Physiologie végétale.
COTTON Physique.

Secrétaire A. GUILLET.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE ROUX

MÈMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Hommage de profonde reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON REGRETTÉ MAÎTRE

A. ÉTARD

EXAMINATEUR A L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE
PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE
PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DASTRE

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

Hommage respectueux.

A MON ONCLE LE DOCTEUR LÉON PIETTRE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

ÂNCIEN SÉNATEUR DE LA SEINE

ÂNCIEN PRÉSIDENT DU CONSEIL GÉNÉRAL DE LA SEINE

A MON PÈRE LE DOCTEUR C. PIETTRE

PROFESSEUR AGRÉGÉ DE L'UNIVERSITÉ

A MA FEMME

A MES PARENTS

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA BILE

INTRODUCTION

C'est sur les conseils de notre maître, M. le professeur ETARD, que nous avons entrepris ces recherches sur la bile et ses pigments.

L'étude de la sécrétion biliaire au double point de vue, anatomique et physiologique, a été faite, dans ses moindres détails, par des savants tels que HOPPE-SEYLER, CLAUDE BERNARD, HEIDENHAIM, DASTRE, HAMMARSTEN, etc.

Au contraire, la connaissance chimique des divers éléments qui constituent la bile, contient encore de nombreuses lacunes, malgré les belles recherches de STRECKER, SCHOTTEN, MYLIUS, LATSCHINOFF.

C'est sur ce terrain de chimie pure pouvant conduire à des résultats intéressant à la fois la médecine et la pathologie générale que nous nous sommes placés dans ce travail divisé en quatre parties :

- I. — *Spectroscopie* ;
- II. — *Méthodes de traitement de la bile* ;
- III. — *Etude des acides biliaires* ;
- IV. — *Pigments biliaires*.

Nous nous excusons des détails expérimentaux et numériques mentionnés en si grand nombre ; mais nous avons cru

utile de les reproduire parce qu'ils constituent la partie essentielle de cette thèse et dans l'espoir qu'ils éviteront aux futurs chercheurs les longs essais de quatre années de labeur.

Nous sommes heureux de pouvoir témoigner ici notre profonde reconnaissance à M. le docteur Roux, directeur de l'Institut Pasteur, pour l'appui moral et matériel qu'il a bien voulu nous donner pendant ces neuf années de travail sous sa direction. Nous devons à M. ETARD d'avoir pu mener à bonne fin le programme de ces recherches grâce à ses conseils éclairés dont nous le remercions bien vivement, et à notre ami, M. A. VILA, préparateur à l'Institut Pasteur, de nous y avoir préparé en nous initiant au détail des manipulations chimiques.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

SPECTROSCOPIE

En Biologie la spectroscopie n'est le plus souvent regardée que comme une méthode de diagnostic; on a recours au spectroscope pour identifier certains produits de l'économie animale ou végétale : sang, bile, chlorophylle. Et cependant la méthode peut être beaucoup plus féconde; une étude rapide du pigment chlorophyllien va nous montrer, en effet, que dans certains cas les bandes d'absorption correspondent bien à un véritable phénomène énergétique, à un acte essentiellement vital.

I. **Historique.** — BREWSTER (1) signale, en 1834, la présence de bandes dans le spectre de la chlorophylle.

BECQUEREL (2), CHAUTARD (3), TIMIRIAZEF (4) revoient et précisent la découverte du biologiste anglais.

Puis très vite les savants orientent leurs recherches du côté physiologique. ENGELMANN en 1882 et REINKE l'année suivante

(1) BREWSTER. On the colours of natural bodies (*Transactions of the royal Society of Edinburgh*, t. XII, 1834).

(2) Actions des rayons différemment réfrangibles sur AgBr et AgI, influence des matières colorantes (*Comptes rendus*, t. LXXIX, 1874).

(3) *Comptes rendus*, 1873; *Ann. de chim. et de phys.*, 1874.

(4) Thèse de Saint-Petersbourg, 1871 et 1872, 1874, 1875.

émettent l'opinion que ces bandes sont en relation avec le phénomène d'absorption.

TIMIRIAZEF (1) en 1886 apporte une série de démonstrations à l'appui de cette hypothèse. Sous l'influence d'un réducteur (zinc et acide acétique), la chlorophylle devient jaune ; en perdant sa couleur verte, elle perd également sa bande du rouge. Ce mélange ainsi jauni peut être conservé indéfiniment en présence d'acide carbonique à l'abri de la lumière ; il verdit au contraire très vite si on l'expose à l'action solaire, au contact de l'oxygène de l'air, et en même temps réapparaît sa bande caractéristique.

C'était établir une première relation entre la matière verte des végétaux et l'oxygène.

Puis il montre, en plaçant des parties vertes de plante, dans diverses régions du spectre, que c'est au niveau des bandes d'absorption que se produit le dégagement maximum d'oxygène au dépens de l'acide carbonique.

Dans ce même ordre d'idées, ENGELMANN constate que si on éclaire une culture de microbes aérobies (il opérait avec le *bacillus amylobacter*) avec un spectre chlorophyllien, ces bactéries viennent se grouper suivant certaines régions axiales qui correspondent aux positions des bandes obscures où de l'oxygène se trouve mis en liberté.

On peut donc conclure que ce sont les bandes qui travaillent ; ce sont elles qui décomposent l'acide carbonique.

Quelques années plus tard, en 1890, TIMIRIAZEF (2) fit faire un grand pas à la question en démontrant qu'il existe une relation entre l'absorption lumineuse par les bandes et la synthèse amylacée.

Reprenant l'expérience de BECQUEREL il lui donne une forme plus concrète, car il la fait porter sur l'amidon et la feuille vivante.

Une feuille verte est placée sous un spectre continu pen-

(1) *Comptes rendus*, t. CII, p. 686.

(2) *Comptes rendus*, t. CX, p. 1346.

dant quelque temps, puis dans l'obscurité. Si alors on la décolore à l'alcool et qu'on l'imprègne de teinture d'iode, on observe qu'aux régions où se trouvaient des bandes d'absorption, correspond un spectre dessiné en iodure d'amidon. Cette expérience démontre, pour les hydrates de carbone, que ce sont les bandes chlorophylliennes et par suite la lumière absorbée qui se trouve en relation avec le travail chimique de l'absorption.

On est conduit sans effort à généraliser et à étendre aux substances albuminoïdes et grasses ce qui se passe pour les hydrocarbures.

Le phénomène spectroscopique prend ainsi une importance considérable au point de vue biologique. Si, en effet, la bande d'absorption s'accompagne de telles manifestations vitales (décomposition de Co^2 avec fixation de carbone et élimination d'oxygène, production rapide d'amidon), il devient clair qu'il s'agit de propriétés appartenant à la substance fondamentale de la vie, au protoplasma cellulaire lui-même.

Dès lors on s'explique la théorie de PRINGSHEIM (1), d'après laquelle la matière verte n'est qu'un écran derrière lequel se passent les actions de la vie ; la chlorophylle serait donc seulement chargée de tamiser une lumière favorable pour le protoplasme. Elle est cependant incomplète ; les bandes ne sont pas seulement des écrans, elles sont aussi et surtout des surfaces d'absorption des radiations nécessaires au fonctionnement du protoplasme ; l'expérience si intéressante de FAMITZINE (2) sur l'orientation des grains chlorophylliens ne contredit nullement cette façon de voir.

Telle est la conception biologique actuelle du phénomène physique de la bande d'absorption : elle est solidement étayée sur de nombreuses expériences.

(1) *Ueber lichtwirkung und chlorophyl funktion in des pflanze Monatsber. d. Berl. Akad.*, juil. 1879.

(2) *Ann. des sc. nat.* [5], t. VII, 1865.

émettent l'opinion que ces bandes sont en relation avec le phénomène d'absorption.

TIMIRIAZEF (1) en 1886 apporte une série de démonstrations à l'appui de cette hypothèse. Sous l'influence d'un réducteur (zinc et acide acétique), la chlorophylle devient jaune ; en perdant sa couleur verte, elle perd également sa bande du rouge. Ce mélange ainsi jauni peut être conservé indéfiniment en présence d'acide carbonique à l'abri de la lumière ; il verdit au contraire très vite si on l'expose à l'action solaire, au contact de l'oxygène de l'air, et en même temps réapparaît sa bande caractéristique.

C'était établir une première relation entre la matière verte des végétaux et l'oxygène.

Puis il montre, en plaçant des parties vertes de plante, dans diverses régions du spectre, que c'est au niveau des bandes d'absorption que se produit le dégagement maximum d'oxygène au dépens de l'acide carbonique.

Dans ce même ordre d'idées, ENGELMANN constate que si on éclaire une culture de microbes aérobies (il opérait avec le *bacillus amylobacter*) avec un spectre chlorophyllien, ces bactéries viennent se grouper suivant certaines régions axiales qui correspondent aux positions des bandes obscures où de l'oxygène se trouve mis en liberté.

On peut donc conclure que ce sont les bandes qui travaillent ; ce sont elles qui décomposent l'acide carbonique.

Quelques années plus tard, en 1890, TIMIRIAZEF (2) fit faire un grand pas à la question en démontrant qu'il existe une relation entre l'absorption lumineuse par les bandes et la synthèse amylacée.

Reprenant l'expérience de BECQUEREL il lui donne une forme plus concrète, car il la fait porter sur l'amidon et la feuille vivante.

Une feuille verte est placée sous un spectre continu pen-

(1) *Comptes rendus*, t. CII, p. 686.

(2) *Comptes rendus*, t. CX, p. 1346.

dant quelque temps, puis dans l'obscurité. Si alors on la décolore à l'alcool et qu'on l'imprègne de teinture d'iode, on observe qu'aux régions où se trouvaient des bandes d'absorption, correspond un spectre dessiné en iodure d'amidon. Cette expérience démontre, pour les hydrates de carbone, que ce sont les bandes chlorophylliennes et par suite la lumière absorbée qui se trouve en relation avec le travail chimique de l'absorption.

On est conduit sans effort à généraliser et à étendre aux substances albuminoïdes et grasses ce qui se passe pour les hydrocarbones.

Le phénomène spectroscopique prend ainsi une importance considérable au point de vue biologique. Si, en effet, la bande d'absorption s'accompagne de telles manifestations vitales (décomposition de Co^2 avec fixation de carbone et élimination d'oxygène, production rapide d'amidon), il devient clair qu'il s'agit de propriétés appartenant à la substance fondamentale de la vie, au protoplasma cellulaire lui-même.

Dès lors on s'explique la théorie de PRINGSHEIM (1), d'après laquelle la matière verte n'est qu'un écran derrière lequel se passent les actions de la vie ; la chlorophylle serait donc seulement chargée de tamiser une lumière favorable pour le protoplasme. Elle est cependant incomplète ; les bandes ne sont pas seulement des écrans, elles sont aussi et surtout des surfaces d'absorption des radiations nécessaires au fonctionnement du protoplasme ; l'expérience si intéressante de FAMITZINE (2) sur l'orientation des grains chlorophylliens ne contredit nullement cette façon de voir.

Telle est la conception biologique actuelle du phénomène physique de la bande d'absorption : elle est solidement étayée sur de nombreuses expériences.

(1) *Ueber lichtwirkung und chlorophyl funktion in des Pflanze Monatsber. d. Berl. Akad.*, juil. 1879.

(2) *Ann. des sc. nat.* [5], t. VII, 1865.

Doit-on la généraliser et l'étendre aux pigments du règne animal, par exemple aux pigments sanguins et biliaires. On y serait conduit par des raisons d'analogie et aussi en se basant sur la remarque suivante : c'est que les substances pigmentaires actives, susceptibles de jouer un rôle dans l'organisme et par suite de subir des modifications possèdent un spectre d'absorption (sang, bile); au contraire les pigments dont l'évolution est achevée ou qui servent d'ornement en sont ordinairement dépourvus (bilirubine, pigments orangés des caroncules de pintades, pigment jaune du bec et des pattes des oiseaux, que nous étudierons plus loin).

Mais si la chlorophylle conduit à la conception des bandes telle qu'elle a été exposée plus haut, on ne voit pas nettement de relation aussi étroite en ce qui concerne le sang et la bile. Quoiqu'il en soit, l'étude des bandes d'absorption de ces deux liquides biologiques présente par elle-même un très grand intérêt scientifique. En collaboration avec A. VILA, nous avons traité longuement de la spectroscopie du sang et de l'hémoglobine ; ici nous ne nous occuperons que de la bile.

Avant d'entrer dans le vif du sujet nous croyons nécessaire et utile de préciser certains points de technique fort importants et qui offrent de réelles difficultés en biologie.

II. Technique. — Examinons brièvement quelques-unes des conditions les plus favorables pour que les observations spectroscopiques soient aussi rigoureuses et complètes que possible. Nous supposons, bien entendu, qu'on dispose d'un bon appareil possédant un excellent prisme et qu'il a été réglé au minimum de déviation.

1° La fente du collimateur doit être choisie bilatérale, c'est-à-dire que l'écartement des lèvres donnant accès aux rayons lumineux doit se faire symétriquement par rapport à un plan médian. Avec les fentes unilatérales on est exposé à des erreurs dans l'appréciation de la situation, de l'étendue et l'intensité des bandes d'absorption. Il peut, en effet, se pro-

duire des déplacements notables, et cela d'autant plus que l'on ouvre plus largement la fente. Telle bande dont l'axe est par exemple $\lambda = 600$ avec une faible ouverture, devient $\lambda = 610$ après une ouverture moyenne et même $\lambda = 615$ au maximum d'ouverture. Avec une grande habitude, on parvient sans doute à corriger ces écarts; il suffit, après avoir observé une bande en grande lumière de la ramener, par une fermeture progressive de la fente, à sa véritable situation une première fois repérée en éclairage convenable. Mais la manœuvre est toujours délicate lorsqu'on a affaire à des solutions fortement absorbantes par suite de leur concentration ou de leur insuffisante limpidité, ce qui est le cas le plus fréquent pour les liquides organiques, sang, bile, etc. On évite ces inconvénients par l'emploi des fentes bilatérales.

2° Le choix de la graduation micrométrique a également une certaine importance à la fois pour la lecture personnelle des observations, et pour leur interprétation identique par tous. Si l'on adopte d'une façon générale la raie D du sodium, comme repère dans les descriptions spectroscopiques, le plus souvent la même harmonie n'existe pas au sujet de la graduation micrométrique vis-à-vis de cette raie. Tel auteur fait coïncider avec D le chiffre 60, tel autre le chiffre 80 de son micromètre. Une convention uniforme rendrait un réel service en facilitant la compréhension et la comparaison des observations de chaque auteur. Au laboratoire de M. ETARD nous avons l'habitude de régler l'appareil de façon que le chiffre 100 du micromètre coïncide avec la raie D du spectre de FRAUENHOFER.

3° Tandis que les raies brillantes des spectres des métaux ou des métalloïdes sont faciles à repérer et à traduire en longueurs d'onde, les difficultés en ce qui concerne les bandes d'absorption sont parfois fort grandes. Ces dernières offrent toujours l'aspect de plages obscures plus ou moins étendues. L'intensité d'absorption rarement uniforme, varie le plus souvent avec la quantité de matière optiquement active. Les bords d'une bande peuvent être très nets, taillés à pic pour

ainsi dire, ou au contraire très vagues, estompés et comme dégradés. Dans ces conditions nettement variables la détermination d'une bande d'absorption est toujours fort délicate. La plupart des auteurs évitent ces difficultés en se servant comme points de repère des lettres A, B, C, D, E, F du spectre de FRAUENHOFFER ; telle bande est comprise entre B et C, etc., telle autre voisine de F, etc. On parvient cependant à la précision nécessaire en adoptant, pour désigner une bande, l'axe de celle-ci. Cet axe qui, étant donné son nom, représente sensiblement le milieu de la bande doit être recherché expérimentalement dans chaque cas particulier. Prenons un exemple, soit à trouver l'axe de la bande α de l'hémoglobine. Pour ce faire, partant d'une solution donnée de ce pigment, nous la diluons jusqu'à ce que la bande α ait été réduite à son minimum d'étendue, qui coïncide avec la limite de visibilité et se rapproche assez près de la raie spectrale, l'axe est au $\lambda = 575$.

Pour les bandes uniformément obscures, l'axe représente le milieu de celles-ci, milieu qui correspond au maximum d'absorption.

Pour celles dont un des bords est plus foncé que l'autre, l'axe est ordinairement plus près de ce bord.

D'une façon générale l'axe expérimental d'une bande représente la ligne d'absorption maxima.

La détermination de cette donnée a une importance en elle-même et parce qu'elle apporte avec elle la connaissance précise de la longueur d'onde moyenne des radiations absorbées par une matière.

4° Enfin pour qu'une observation spectroscopique soit complète il est nécessaire que soit défini, délimité le champ du spectre éclairé. Très souvent, en effet, le rétrécissement aux deux extrémités du spectre visible donné comme caractère spectroscopique d'une substance est dû non à une absorption spécifique, mais à une insuffisance d'éclairage ou à une trop grande concentration. Supposons que l'on examine une solution de chlorophylle dans de l'alcool ou de la benzine ; si la

solution est diluée on observe aisément le groupe très important des bandes situées dans le rouge et l'orangé ; si au contraire la concentration est forte cette partie du spectre est totalement obscure.

Nous examinerons encore deux points de technique : la question des récipients destinés à recevoir les liquides à étudier et enfin celle de l'éclairage.

5° En physiologie ou en médecine légale on utilise de petites cuves en verre de forme triangulaire ou prismatique. Dans ces conditions l'épaisseur du liquide soumis à l'action de la lumière ne dépasse pas 2 à 4 centimètres. Mais déjà depuis longtemps les chimistes utilisent des tubes en verre pouvant atteindre jusqu'à 1 mètre et plus. C'est par l'emploi de ces tubes que l'on a pu établir l'existence de spectres pour de très nombreuses substances chimiques, et en particulier pour des composés incolores : eau, alcool, chloroforme, acide cyanhydrique, etc.

M. ETARD, le premier, introduisit en biologie l'usage des tubes longs et en fit une application féconde dans l'étude des chlorophylles. Le dessin ci-joint montre qu'il s'agit de tubes en T dont les surfaces doivent être parfaitement planes.



Fig. 1.

Ce perfectionnement du matériel technique nous a permis avec la collaboration de A. VILA (1) d'aborder avec succès

(1) PIETTRE et VILA. *Comptes rendus*, p. 390-685-1060-1330-1707, t. CXL, 1905.

l'étude spectroscopique du sang et d'apporter des résultats en grande partie nouveaux aux connaissances anciennes.

C'est en examinant, dans les tubes de M. ETARD, un échantillon de sang frais, prélevé aseptiquement sur un malade soupçonné d'intoxication par l'oxyde de carbone, que nous avons été mis dans la bonne voie. L'extraction des gaz ainsi que l'examen à la cuve prismatique ne nous ayant rien donné, nous avons eu l'idée de transvaser le contenu de cette cuve dans un tube long de petit calibre. Nous eûmes alors la bonne fortune de constater dans ce même liquide, à la même dilution, mais peu sous une plus grande épaisseur, la présence, outre les deux bandes α et β , d'une troisième bande très faible, axe 87 ($\lambda = 634$). Cette expérience répétée plusieurs fois, dans les conditions les plus variables, permettait donc d'établir une relation étroite entre l'existence de cette bande et la notion de longueur et enfin de compte entre la bande et le sang.

Ce qui était vrai pour le liquide total l'était également pour son pigment. L'oxyhémoglobine cristallisée faite le plus purement possible, avec ou sans alcool, avec ou sans éther, présentait sous une grande épaisseur la bande $\lambda = 634$, invisible à la même concentration dans la cuve classique.

La conclusion logique de ces expériences était la suivante : dès que le pigment sanguin a quitté le complexe globulaire, il possède un spectre à trois bandes : α ($\lambda = 575$), β ($\lambda = 535$) et γ ($\lambda = 634$).

L'usage des tubes longs donne en outre à la méthode spectroscopique une exquise sensibilité. Ils permettent non seulement de déceler la présence de traces d'un corps qui échapperait fatalement à l'observation en cuve, mais encore de suivre les variations d'intensité, détendue des bandes d'absorption. C'est qu'en effet, sur une grande longueur, les rayons lumineux entrent plus longtemps en contact intime avec la substance intime et ainsi se trouve compensée au delà la dilution de celle-ci.

Dans ces recherches sur le pigment sanguin nous avons pu constater et suivre l'influence curieuse de certains sels miné-

raux sur le spectre d'une substance biologique aussi complexe que l'hémoglobine.

Si, en effet, à une solution très étendue d'hémoglobine, on ajoute quelques centimètres cubes d'une liqueur à 20/100 de fluorure de sodium, on observe que la bande $\lambda = 634$ se déplace et devient $\lambda = 612$.

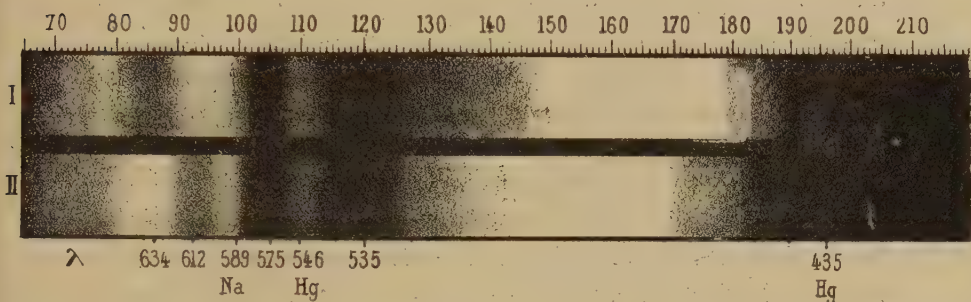


Fig. 2.

Ce n'est pas là une simple coïncidence ; il s'agit bien d'un véritable déplacement que l'on voit se produire sous les yeux.

Un poids donné de pigment en solution exige un minimum de fluorure pour que la migration ait lieu. Une fois établie elle peut être supprimée (la bande $\lambda = 612$ reprend sa position primitive $\lambda = 634$) par simple addition d'une nouvelle quantité d'hémoglobine, etc. Enfin il existe des proportions des deux substances, hémoglobine et NaF, pour lesquelles les bandes $\lambda = 684$ et $\lambda = 612$ coexistent, comme s'il s'établissait un équilibre optique correspondant à l'équilibre chimique.

Ce phénomène spectroscopique est tellement sensible qu'il peut être utilisé très avantageusement pour la caractérisation médico-légale du sang et, en même temps, pour la recherche du fluor (sauf dans certaines conditions exceptionnelles signalées par A. VILA (1) et nous-mêmes) ; par exemple, en liqueur

(1) A. VILA et M. PIETTRE. *Société chimique de Paris*, 3^e série, t. 35, p. 685 ; 1906.

neutre une solution d'oxyhémoglobine peut déceler la présence de 6/10.000 de NaF et en milieu légèrement acide par l'acide acétique 5/1.000.000 de ce sel.

L'emploi des tubes d'Etard permet enfin le dédoublement des bandes superposées. Il arrive, en effet, pour certaines substances, en particulier celles dont le spectre est riche en bandes d'absorption, qu'étant donnée leur étendue, deux d'entre elles peuvent se confondre plus ou moins. On est averti, en général, de ce chevauchement, par une brusque augmentation d'opacité de la plage obscure au niveau de la fusion. L'examen en tube rend possible le dédoublement qui ne peut être observé qu'en liqueurs très étendues.

6° Les sources de lumières utilisées en spectroscopie sont le bec AUER ou l'arc électrique. Ce dernier offre entre autres inconvénients de fréquentes variations d'intensité et surtout la présence dans le spectre des raies du carbone et de certains métaux. Le bec AUER représente certainement la source de choix comme uniformité et régularité, mais elle devient insuffisante pour éclairer les extrémités du spectre surtout lorsque les observations portent sur des solutions très absorbantes. Avec A. VILA nous lui avons substitué, dans ces derniers cas, la lampe NERNST de 65 bougies. Très riche en rayons voisins de l'infra-rouge la lumière de cette source rend possible l'exploration de la partie rouge du spectre.

Telles sont les conditions les plus importantes qu'il est utile de rappeler; elles sont surtout nécessaires en biologie où l'on a rarement à examiner des solutions parfaites. Ce sont le plus souvent des mélanges complexes de composés organiques à molécules très élevées. Leur transparence est insuffisante, et la moindre dilution y détermine la formation de précipités difficiles à séparer.

CHAPITRE II

SPECTROSCOPIE DE LA BILE

De très nombreuses et très importantes recherches ont été faites, nous les résumerons au cours de cet exposé.

Nous n'étudierons que quelques types de bile : d'homme, de chien, de porc, de poule (*gallus domesticus*) et de poisson Colin (*merlucius vulgaris*).

Les vésicules biliaires (1) qui nous ont servi ont été recueillies aux abattoirs parisiens ou aux halles centrales.

Après lavages à l'eau distillée des vésicules souvent souillées de sang et d'autres impuretés, la bile était reçue dans des vases maintenus à température relativement basse.

Les observations étaient faites en cuves et en tubes d'ETARD, avec ou sans dilution.

Certains échantillons parfaitement limpides se prêtent à l'examen optique ; mais la plupart sont plus ou moins troubles, et souvent l'addition d'eau distillée provoque la formation de précipités qui gênent beaucoup le passage de la lumière.

Comme pour le sang l'emploi de fluorure de sodium nous a rendu de grands services. Si l'on ajoute, en effet, même de très faibles quantités de fluorure à un échantillon trouble de bile, il se produit très vite un léger précipité floconneux qui englobe et entraîne les éléments en suspension. De même si pour étendre une bile on utilise la même solution fluorée, le trouble que produit l'addition d'eau pure se rassemble et tombe au fond de la liqueur biliaire.

Nous verrons, comme cela avait été démontré par nos pré-

(1) Ces recherches ont porté uniquement sur la bile de la vésicule, plus facile à se procurer dans les meilleures conditions de pureté.

décresseurs, que les biles des différentes espèces animales n'ont pas un spectre identique, mais en outre nos recherches démontrent que dans une même espèce il y a des différences individuelles qui dépendent en particulier du nombre, de la nature et de la quantité des pigments, toutes choses variables dans chaque cas.

Bile de l'homme. — Nous n'avons pu disposer que de quelques vésicules qui nous ont été remises par le docteur GÉRY, attaché à l'hôpital Pasteur.

Leur contenu très visqueux était brun-marron en couche épaisse, orangé foncé en couche mince.

Examinée en cuve prismatique, présence de deux faibles bandes ; axe 107 ($\lambda = 572$) et axe 121 ($\lambda = 535$), beaucoup plus accentuées sur une longueur de 10 centimètres.

Dans cette dernière condition on observe une nouvelle bande, axe 600 ($\lambda = 600$). Le spectre devient donc (fig. 3-II).

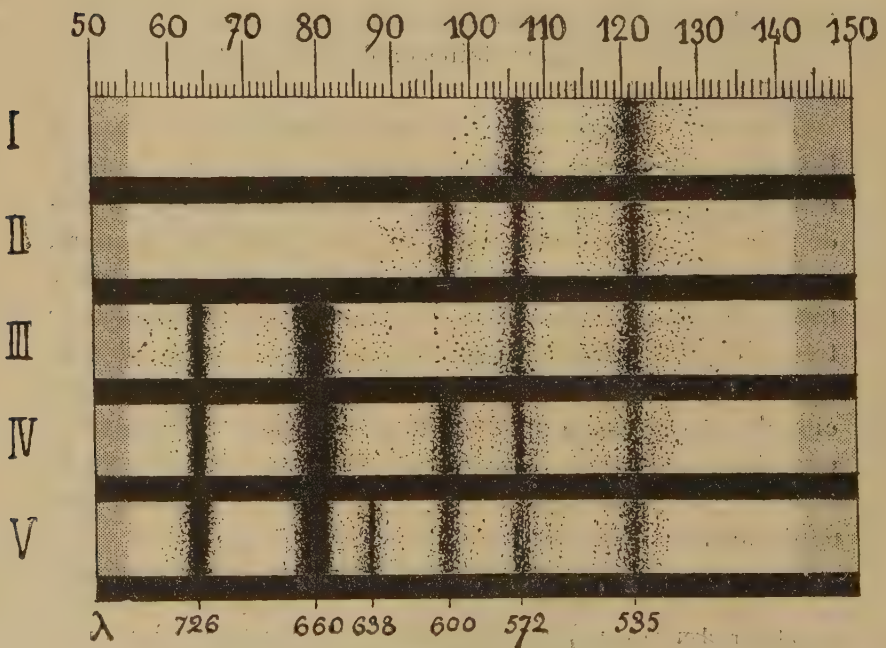


Fig. 3.

Bile du porc. — La couleur est fort variable ; tantôt d'un jaune extrêmement pâle, tantôt orangé-foncée, assez rarement brune. A cette teinte fondamentale jaune orangée s'ajoute fréquemment une nuance verte due à la présence d'une faible quantité de pigment vert ; cette superposition des couleurs est d'ailleurs un caractère commun à presque toutes les biles, elle s'explique par la coexistence de plusieurs pigments.

Si on s'en rapporte aux descriptions classiques « la bile de porc ne possède pas de spectre à l'état frais, mais quatre heures après son extraction de la vésicule biliaire, elle apparaît brune en couche épaisse et jaune en couche mince ; elle donne une bande d'absorption faible, située à gauche de D, puis une absorption continue s'étendant dans le vert, de la moitié de l'espace entre D et E, jusque dans la région ultraviolette » HENOCQUE.

Il s'agit là certainement d'observations incomplètes.

Nous avons, en effet, établi les deux points suivants :

La bile de porc fraîche possède toujours un spectre ;

Les bandes d'absorption de ce spectre varient de nombre et d'intensité suivant la coloration des échantillons.

Les biles très peu colorées possèdent les deux bandes fondamentales $\lambda = 572$ et $\lambda = 535$ (fig. 3, spectre I).

Dans les échantillons plus foncés, l'intensité de ces plages est fortement augmentée.

Enfin lorsqu'elle est nettement orange foncée et surtout verdâtre il s'ajoute la bande $\lambda = 600$.

Bile du chien. — La coloration de la bile du chien est également variable, tantôt orangée très pâle, tantôt orangé foncée, enfin assez fréquemment brun verdâtre.

Le spectre suit plus ou moins étroitement ces différentes nuances (fig. 3, spectre V).

Parmi les auteurs qui ont le plus étudié cette bile au point de vue spectroscopique il faut citer MM. WERTHEIMER et MEYER qui lui ont consacré un long article très documenté dans les *Archives de physiologie*.

Nous reproduisons les conclusions de ce travail : « Si l'on

expose devant la fente du spectroscopie, de la bile de chien, contenue dans une cuve prismatique ou simplement dans un tube à essai, diluée ou nature, on voit très nettement une bande dans le rouge. Le bord droit de la bande est assez net, son bord gauche se confond quelquefois avec l'extrémité moins éclairée du spectre. Alors pour la distinguer il faut augmenter la quantité de lumière en élargissant quelquefois la fente du collimateur. Cette bande est comprise entre $\lambda = 675$ et $\lambda = 653$, entre B et C bordant et recouvrant même C suivant qu'elle est plus ou moins large. A côté de cette première bande on en trouve une deuxième, bien moins foncée, entre C et D, tout près de D, $\lambda = 615$ à $\lambda = 590$. Celle-ci peut facilement passer inaperçue sauf dans certains cas où elle est également bien prononcée. L'autre a toujours été apparente chez plus de 60 chiens ».

Les résultats de nos observations ici encore diffèrent de celles de nos devanciers, nous les résumons dans les lignes suivantes :

Dans les biles de coloration très pâles (orangé clair) on n'observe nettement que les bandes du vert $\lambda = 572$ et $\lambda = 635$.

Lorsque la coloration est plus foncée la bande $\lambda = 638$ devient visible.

Dans les biles orangé foncé, outre ces trois bandes, on constate la présence de la bande signalée par MM. WERTHEIMER et MEYER, dont nous avons déterminé l'axe $\lambda = 660$, et très fréquemment l'existence d'une fine absorption dans l'orangé axe $\lambda = 638$.

Enfin dans les échantillons à teinte verdâtre en particulier il se produit une absorption plus ou moins intense dans l'extrême rouge. Pour que l'observation et surtout le repérage en soit possible il faut disposer d'un fort éclairage (lampe NERNST) qui éclaire la région rouge jusqu'à la graduation 55 du micromètre. Dans ces conditions nous avons repéré très nettement une bande axe 63, $\lambda = 726$. L'addition préalable de

NaFl à la bile rend plus facile l'observation extrêmement pénible et très fatigante pour la vue.

Bile des bovidés. — L'étude de la bile de bovidé va nous donner un exemple plus typique encore au point de vue optique des variations individuelles et des relations très étroites entre le spectre d'une bile et sa coloration objective.

Prenons une série de vésicules biliaires, plusieurs centaines, et examinons successivement le contenu de chacune d'elles au spectroscope en prenant toutes les précautions déjà indiquées. Nous constaterons très vite que les résultats ne sont pas identiques.

Tels échantillons possèdent un spectre à deux bandes d'absorption ; axes : $\lambda = 572$ et $\lambda = 535$; tels autres ont au contraire un spectre à quatre bandes ; dont deux communes $\lambda = 572$ et $\lambda = 535$ et deux nouvelles, dans la région rouge, axes : $\lambda = 660$ et $\lambda = 726$ (fig. 4).

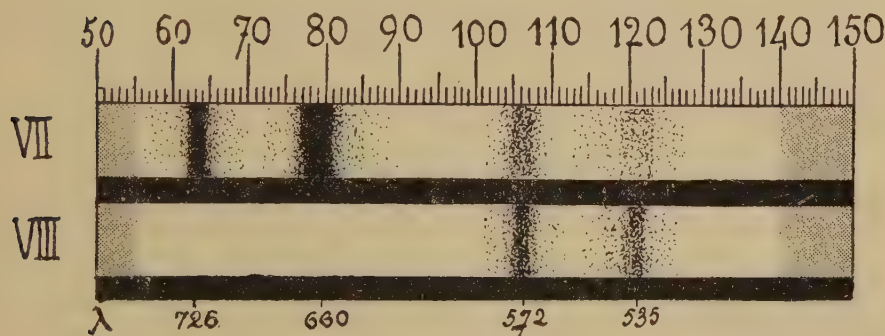


Fig. 4.

En outre, au point de vue intensité des bandes, il y a autant de nuances sensibles à l'œil que de biles examinées.

Ces deux spectres différents correspondent aux deux colorations principales de la bile des bovidés. Il existe, en effet, chez ces animaux, des biles vertes et des biles orangées, avec des nuances intermédiaires mais faciles à ramener d'un côté ou de l'autre. La proportion des premières est d'environ 65 o/o par

rapport aux autres. Nous pouvons ajouter que la coloration de la bile ne se modifie pas tant qu'elle séjourne dans la vésicule, même après un temps très considérable. D'autre part, extraite, elle ne change pas non plus, mais à la condition d'être recueillie et conservée purement à l'abri des germes. Sous l'influence des bactéries de la putréfaction elle vire rapidement du vert à l'orangé, puis tend à la décoloration progressive.

On se rend compte de la couleur d'une bile sans qu'il soit besoin d'ouvrir la poche biliaire, en examinant la vésicule après l'avoir débarrassée de la couche de graisse qui l'entoure fréquemment. Par transparence la teinte de la bile apparaît nettement.

Il ne semble pas que l'alimentation ait une influence certaine sur cette coloration ; sur des animaux provenant du même élevage et soumis au même régime alimentaire on trouve des biles vertes et d'autres orangées.

Quoi qu'il en soit, le spectre à deux bandes dans le jaune-vert, $\lambda = 572$ et $\lambda = 535$ correspond aux biles orangées (VIII, fig. 4) ; celui à quatre bandes (VII, fig. 4) $\lambda = 572$, $\lambda = 535$, $\lambda = 660$, $\lambda = 726$ appartient aux biles vertes. Les colorations intermédiaires se traduisent par des variations dans l'intensité relative des deux groupes de bandes : lorsque le vert augmente, le groupe optique du rouge acquiert plus d'étendue et d'opacité ; au contraire lorsque c'est l'orangé le groupe jaune-vert prédomine.

Ce dernier existe dans tous les échantillons ; il constitue donc le spectre fondamental de la bile.

Cette notion de proportionnalité de l'intensité des bandes à la quantité de substance active est sans doute bien connue, mais ici elle frappe plus vivement l'esprit parce qu'elle permet d'apprécier d'une façon approximative le mélange des deux teintes. C'est un procédé de colorimétrie indirecte.

Ces variations très nettes conduisent à cette conclusion que le spectre de la bile, chez le bœuf, n'est pas dû à un seul et même pigment. S'il en était ainsi, il existerait une harmonie

et un synchronisme parfait au point de vue du nombre des bandes et de leur intensité. Or, au contraire, nous avons constaté une indépendance très grande et qui peut même être complète entre le groupe du vert et celui du rouge. Il existe donc, dans la bile nature, au moins deux pigments pour expliquer cette discordance. De ces faits il résulte que l'hypothèse de MAC-MUNN, sur la présence d'un seul pigment, la cholo-hématine, doit être rejetée.

Les biles de bovidés jeunes (veau) et de mouton donnent lieu exactement aux mêmes observations et aux mêmes conclusions.

Bile d'oiseau. — Poulet (*gallus domesticus*). — Bile peu visqueuse, de coloration vert brunâtre ou parfois seulement orangé brun.

Sous une faible épaisseur on observe les bandes ($\lambda = 572$) et ($\lambda = 535$).

Après dilution ($\lambda = 600$).

Avec éclairage à la lampe NERNST et forte dilution en tube long les bandes du rouge axe 63 ($\lambda = 726$) et axe 79 ($\lambda = 660$) (fig. 3, spectre IV).

Bile de poisson. — Colin (*merlucius vulgaris* Cuv.). — Bile extrêmement visqueuse, presque solide, de coloration verte très riche ; chaque vésicule contient à peine de 0,8 à 1 cc. 5.

Aucun examen ne peut être fait sans dilution préalable.

Une faible dilution doit être observée dans la cave triangulaire au niveau de son épaisseur moindre. On constate l'existence des deux bandes, axe 107 ($\lambda = 572$) et axe 121 ($\lambda = 535$) ; dans le rouge absorption totale qui gagne la moitié de l'orangé.

Avec éclairage à la lampe NERNST on isole nettement une large plage obscure qui s'étend de 56 à 85 dans la graduation micrométrique et laisse à gauche une étroite fenêtre rouge.

Si l'on dilue fortement en présence de NaF on dédouble cette plage en deux bandes séparées par un espace franchement lumineux.

Pour ramener ces bandes à leur axe, il faut réaliser une

énorme dilution : dans ces conditions la plus extrême possède comme axe 63 ($\lambda = 726$) et l'autre axe 79 ($\lambda = 660$ (fig. 3, spectre III).

Conclusions. — On remarque qu'il existe dans le spectre des différentes biles à côté des bandes variables d'autres bandes permanentes. Ces bandes constantes sont axe 107, $\lambda = 572$ et axe 121, $\lambda = 535$.

Comparées aux bandes vertes de l'hémoglobine on constate une identité presque complète. Au point de vue situation dans le spectre, mêmes rapports :

$$\text{Hémoglobine} \left\{ \begin{array}{l} \text{bande } \alpha \text{ axe : } \lambda = 575 \\ \text{bande } \beta \text{ axe : } \lambda = 535 \end{array} \right. \quad \text{Bile} \left\{ \begin{array}{l} \text{axe : } \lambda = 572 \\ \text{axe : } \lambda = 535 \end{array} \right.$$

Mêmes relations au point de vue intensité ; la bande α dans les deux spectres est la moins étendue et la plus opaque. On voit dès lors combien devient délicate toute différenciation spectroscopique, problème qui cependant se pose fréquemment en médecine légale et en clinique.

Sans parler des procédés chimiques on parvient toujours à une solution certaine en utilisant notre réaction, déplacement de la bande axe $\lambda = 634$ à axe $\lambda = 612$ sous l'influence du fluorure de sodium, phénomène spécifique du sang et de son pigment.

Pendant nos recherches optiques sur le sang et la bile nous avons eu l'occasion d'examiner, au spectroscope, des solutions de chlorophylles, dans l'alcool, le sulfure de carbone, l'éther de pétrole, préparées par M. ETARD, ainsi que des feuilles vivantes de plusieurs végétaux. En comparant les spectres des pigments les plus importants du monde végétal et animal : sang, bile, chlorophylle, nous avons remarqué une relation très intéressante entre la coloration objective de ces substances et la position de leurs bandes d'absorption.

Les matières pigmentaires vertes (chlorophylle, bile) ont leurs bandes principales groupées dans la région rouge du spectre ; ce sont :

pour la chlorophylle : le groupe des bandes compris entre
B et C.

pour la bile verte $\left\{ \begin{array}{l} \text{axe : } \lambda = 726 \\ \text{axe : } \lambda = 660. \end{array} \right.$

Au contraire les matières pigmentaires rouges ou orangées ont leurs bandes dans le jaune et le vert ; ce sont :

pour l'hémoglobine $\left\{ \begin{array}{l} \text{axe : } \lambda = 575 \\ \text{axe : } \lambda = 535 \end{array} \right.$

pour la bile orangée $\left\{ \begin{array}{l} \text{axe : } \lambda = 572 \\ \text{axe : } \lambda = 535 \end{array} \right.$

Les premières, vertes, ont donc leurs bandes dans la couleur complémentaire le rouge.

Les secondes rouges ou orangées, ont leurs bandes dans la complémentaire verte.

Ces faits semblent donc bien en harmonie avec la théorie classique des couleurs complémentaires et d'une façon plus particulière avec la couleur des objets.

Sans insister sur ce côté purement physique de la question il se dégage une conclusion pratique de ces remarques ; c'est qu'étant donné une substance colorée, il y a beaucoup de chances pour que dans son spectre se trouvent des absorptions localisées au niveau de sa couleur complémentaire ; c'est donc dans la complémentaire qu'il faut d'abord chercher.

Au point de vue biologique, le rapprochement sur le terrain optique des deux pigments les plus répandus dans le monde des êtres vivants, l'hémoglobine et la chlorophylle, mérite les quelques lignes suivantes.

Ils ont des caractères physiques et fonctionnels très différents :

L'hémoglobine est rouge, ses bandes principales sont

(1) Nous sommes profondément reconnaissant à M. P. LAMBERT d'avoir bien voulu mettre à notre disposition sa belle installation de spectrophotographie. Ces figures sont pour la plupart des reproductions de ses remarquables clichés.

situées dans le vert, elle préside à la respiration (fixation de l'oxygène par les tissus, dégagement de CO^2).

La chlorophylle est verte, ses bandes fondamentales sont situées dans le rouge, elle préside à l'assimilation chlorophyllienne (fixation de carbone et libération d'oxygène).

Ce sont donc deux pigments complémentaires dans toute l'acception du terme.

DEUXIÈME PARTIE

SÉPARATION DES DIVERS ÉLÉMENTS DE LA BILE

Les méthodes de traitement de la bile ont été surtout des méthodes analytiques.

Les deux plus employées en physiologie jusqu'à présent peuvent se résumer en quelques lignes.

Historique. — *Procédé d'Hüfner.* — On ajoute à la bile extraite de la vésicule biliaire son volume d'alcool à 83° centésimal. De cette façon on précipite la mucine, une partie des sels et des traces de pigments biliaires. On sépare par filtration un précipité et une liqueur. Le précipité est séché puis pesé. On incinère et on pèse de nouveau. On obtient ainsi le poids des substances minérales. La différence donne la quantité de mucine.

La liqueur filtrée contient les substances grasses, les cholestérines, lécithines, graisses, savons alcalins et sels biliaires. On évapore et on redissout dans l'eau les savons et les sels biliaires ; les graisses neutres restent insolubles.

La solution aqueuse est épuisée à l'éther qui enlève les cholestérines, lécithines et les graisses.

L'extrait éthéré est traité pour déterminer la proportion relative des graisses, cholestérines et lécithines ; on distille l'éther, et le résidu pesé est divisé en deux portions qui servent à doser les cholestérines et lécithines ; on calcule les graisses par différence. Une partie est traitée par l'alcool à 80° ; on chauffe au bain-marie après addition de potasse jusqu'à

saponification complète. On évapore à sec pour chasser tout l'alcool puis on reprend par l'eau qui dissout seulement les savons. Par épuisement à l'éther on enlève les cholestérines qui peuvent être séchées et pesées.

La seconde partie sert à doser les lécithines. Pour cela on calcine en présence d'un mélange de carbonate de soude et de nitrate de potassium.

Le phosphore passe à l'état de phosphate alcalin que l'on précipite sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien et que l'on pèse à l'état pyrophosphate de magnésie. Du poids de P^2O^5 trouvé on déduit celui des lécithines.

Les graisses sont données par un calcul de différence. On peut aussi acidifier les savons alcalins, recueillir dans l'éther les acides gras et les peser directement.

La solution aqueuse contenant les sels biliaries est acidifiée par l'acide chlorhydrique. On précipite ainsi les acides gras et les acides biliaries. Un traitement à l'éther permet de séparer les deux.

Procédé classique. — On mélange la bile avec un quart de son volume de noir animal ; on agite et on laisse en contact, puis le mélange est évaporé à sec au bain-marie. On reprend par l'alcool fort et à chaud ; on filtre. L'épuisement doit être complet.

Le résidu formé de charbon a retenu la mucine, pseudo-mucine, sels minéraux et pigments. On le lave à l'eau pour lui enlever les sels minéraux qui seront pesés après dessiccation.

La solution alcoolique contient les sels biliaries, les graisses et la cholestérine. Par addition d'éther les sels biliaries sont précipités à l'état amorphe pouvant cristalliser (Bile de PLATTNER).

Dans l'éther se trouvent graisses et cholestérines que l'on isole par saponification des graisses.

Une autre partie de la bile est séchée à poids constant pour obtenir le résidu sec. Par incinération de ce résidu on obtient les cendres.

Enfin sur un troisième prélèvement on isole les mucines et les pigments. On y parvient en évaporant, à sec, au bain-marie, un volume connu de bile et en épuisant le résidu sec avec l'alcool.

Comme nous l'avons déjà dit, ces techniques sont surtout des méthodes théoriques d'analyse et non de traitement de la bile devant permettre d'isoler exactement les différentes substances qu'elle contient.

Les points délicats, séparation des sels biliaires, isolement des divers pigments, sont laissés dans l'ombre. Même au point de vue chimique elles ne présentent pas toutes les garanties ; en outre, un certain nombre d'éléments sont dosés par différence, c'est-à-dire, simplement calculées.

Ces méthodes classiques ne répondent donc qu'imparfaitement aux exigences théoriques et sont insuffisantes au point de vue pratique.

Nous plaçant uniquement sur le terrain biologique nous avons cherché à instituer une technique qui conduise à une séparation méthodique des divers principes de la bile.

Déjà dans nos travaux sur le sang (1), en collaboration avec A. VILA, nous avons inauguré l'application systématique de l'isolement progressif des principes immédiats.

Partant du globule sanguin, grossièrement séparé par décantation du plasma, nous l'avons soumis à des lavages dans la solution physiologique de NaCl à 8,5 o/oo, suivis de centrifugations jusqu'à complète élimination de substances étrangères. Puis il a été scindé rigoureusement en ses deux portions principales ; hémoglobine et stroma (2), grâce à un nouveau procédé de laquage, qui consiste à provoquer l'hématolyse par l'éther, en liqueur isotonique, et non plus en présence d'un grand excès d'eau distillée qui dissout partiellement le stroma et entraîne en solution une forte proportion des substances minérales intra-globulaires. Dans ces condi-

(1) PIETTRE et VILA, *C. R. Académie des sciences, loc. cit.*

(2) VILA et PIETTRE, *C. R. Académie des sciences*, p. 787, t. II, 1906.

tions bien spéciales d'isotonie globulaire l'éther réalise lentement l'hématolyse et soustrait à l'action de l'eau le stroma aussitôt libéré, en même temps qu'il dissout les matières grasses, acides, savons, graisses, cholestérines et lécithines qui entourent plus ou moins l'hématie. Toute l'hémoglobine passe dans la liqueur salée d'où on peut l'obtenir en magnifiques cristaux par addition d'alcool et refroidissement. Tandis que les techniques classiques négligent, tantôt le pigment sanguin pour obtenir son substratum albuminoïde, tantôt au contraire ce dernier pour isoler le premier, notre méthode ne sacrifie aucune des substances : hémoglobine, stroma avec ses sels, matières grasses qui les accompagne.

L'hémoglobine à son tour, la plus importante des substances du globule sanguin, a été séparée en ses deux principes immédiats, la globine, matière albuminoïde, incolore, amorphe, et l'hématine colorée et ferrugineuse, obtenue pour la première fois à l'état cristallisé par A. VILA et nous-même (1).

Enfin l'hématine elle-même soumise à des saponifications répétées se scinde en deux portions, une substance riche en azote, et un groupe de matières ternaires, sans fer ni azote, de composition très voisine des acides gras élevés de la série alliphatique.

On peut donc ainsi, étant donné une individualité histologique, en suivre le dénombrement progressif en ses différentes parties constituantes, étudier tel ou tel terme plus particulièrement ou encore déterminer les variations d'un élément au cours des séparations analytiques.

Dans le cas du pigment sanguin, par exemple, ou le fer est un élément d'une importance primordiale, on voit que partant du globule sec peu riche en fer, on sépare l'hémoglobine contenant chez le cheval 0,375 p. 100 de Fe et enfin l'hématine cristallisée dont la teneur s'élève à 9,20 p. 100.

Il est un autre point capital en matière de biologie et qui découle comme une conséquence des considérations précé-

(1) PIETTRE ET VILA. *Comptes rendus*, p. 1047, t. II, 1905.

dentes, c'est la nécessité de mettre en œuvre, pour les recherches longues et délicates, de poids relativement considérables de matière initiale.

Puisqu'en effet, chaque manipulation importante aboutit à une scission de la substance initiale en deux ou plusieurs faisceaux, il résulte après un certain nombre de fragmentations une réduction de poids parfois très considérable. Un litre de sang de cheval traité pour la préparation des hématies et de leur pigment donne pratiquement :

2,6 de stromas,
75,8 d'hémoglobine cristallisée,
0,70 d'hématine cristallisée.

Les dernières portions de la matière peuvent donc échapper à l'observation, étant donné leur poids peu élevé. Supposons, en effet, que nous ayons pratiqué la saponification de l'hématine sur une très petite quantité de substance, les produits de l'hydrolyse auraient pu passer inaperçus. Au contraire, en opérant sur 2 grammes, quantité importante pour une matière si difficile à préparer, nous avons recueilli des acides gras très intéressants.

Ces notions qui paraissent si logiques tant elles sont simples, nous devons à M. ETARD d'en avoir compris toute l'importance. Elles sont devenues une règle de travail dans son laboratoire.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE SPÉCIALE A LA BILE DE PORC

Nos premières recherches de technique ont porté sur la bile de porc qui seule se prête bien aux expériences qui vont suivre.

La bile de cet animal extraite des vésicules dans des conditions que nous indiquerons plus loin est recueillie dans des vases de forme haute puis mise à la glacière pour éviter toute putréfaction.

Au bout de 48 heures il s'est fait deux couches. La couche supérieure de coloration jaune légèrement orangée est parfaitement limpide ; l'inférieure, environ quatre fois moins importante, d'un jaune très claire, ressemble à une boue formée de débris cellulaires, de mucosités et de précipités biliaires amorphes ou cristallisés.

La densité de la bile totale est égale à $\delta = 1025$ à 18° .

Après repos la densité du liquide clair est devenue $\delta = 1018$.

Par décantation et siphonnage on parvient à isoler presque complètement cette dernière portion qui seule sera traitée. Versée dans un récipient, la bile est additionnée d'un acide minéral étendu par petites quantités, et en mélangeant énergiquement. Il est préférable d'employer l'acide sulfurique qui peut être éliminé ultérieurement à l'état de sulfate de baryum. Dès que la réaction est devenue acide et qu'il ne se fait plus de précipité, on cesse l'addition de réactif.

L'acide sulfurique sature la soude et la potasse des savons et des sels biliaires et précipite les acides correspondants sous forme de masses grumeleuses, jaunâtres, amorphes ; en même temps la liqueur se décolore totalement. En quelques

minutes le précipité se dépose, laissant au-dessus une solution aqueuse à peu près incolore.

On sépare par décantation le précipité de la liqueur sus-jacente. On le lave à plusieurs reprises, en l'agitant et en le fragmentant avec les mains, jusqu'à ce que les eaux ne soient plus acides. Ces lavages sont ensuite continués un certain nombre de fois pour extraire les substances solubles dans l'eau, qui ont été entraînées par la défécation sulfurique. On sèche alors sur trompe la masse organique insoluble.

On obtient ainsi trois parties :

Une solution aqueuse acide ;

Une solution aqueuse neutre ;

Et les acides biliaires.

Les extraits entraînent avec eux, malgré la filtration de très fines aiguilles d'acides gras, qui leur donnent un aspect soyeux.

I. Solution aqueuse acide. — La solution aqueuse acide est légèrement concentrée au bain-marie puis additionnée de baryte jusqu'à neutralisation de l'acide sulfurique à l'état de sulfate de baryum. Il vaut mieux cependant rester sur légère acidité, pour ne pas détruire les bases organiques, ce que l'on obtient d'une façon sûre en acidifiant très légèrement après avoir neutralisé par la baryte. On filtre les sulfates de baryum qu'on lave sur trompe. Les eaux sont concentrées ; elles déposent des sels alcalins, sulfates, chlorures, phosphates, des sels alcalino-terreux, phosphates et sulfates de chaux, des bases cristallisables, en particulier de très petites quantités de choline déjà signalée par STECKER.

II. Solution aqueuse neutre (ou très légèrement acide). — A son tour elle est concentrée à sec au bain-marie. Elle laisse comme résidu une matière brunâtre, sirupeuse, d'odeur fade, de saveur à la fois amère et sucrée. La fonction chimique de cette substance est acide car elle se dissout dans les alcalis, et les acides la précipitent de ses solutions basiques sous forme d'une poix blonde.

Après dessiccation elle est soumise à un épuisement par l'éther qui enlève les acides gras.

La portion la plus importante est constituée par l'acide amer de la bile, l'acide taurocholique, comme le démontre l'hydrolyse acide. En effet, si on fait subir pendant plusieurs heures à cet acide azoté l'action de l'acide sulfurique étendu et chaud, on obtient une résine amorphe, brune, sans saveur appréciable; molle à chaud, cassante à froid, insoluble dans l'eau et les acides, soluble dans les alcalis, dans les acides et qui brûle sur la lame de platine, en fondant et en s'étalant, comme une graisse. Dans les jus d'hydrolyse cristallisé par concentration et refroidissement, une matière azotée, sous forme de beaux prismes qui, sous l'influence de la calcination, dégagent de l'acide sulfureux. Ce sont des cristaux de taurine.

L'extrait aqueux est donc surtout formé d'acide taurocholique.

III. Précipité biliaire. — Le précipité obtenu par l'addition d'acide sulfurique à la bile contient la presque totalité des matières organiques. Quelle que soit la dilution de l'acide, il se fait une précipitation massive qui englobe des substances autres que les acides biliaires insolubles.

La quantité d'acide nécessaire pour provoquer cette défécation totale est indiquée par un titrage préalable des alcalins combinés dans la bile nature. L'expérience montre qu'il faut ajouter environ 86 cc. de la solution normale d'acide pour saturer 100 cc. de bile. Si l'on recueille sur filtre le précipité ainsi obtenu et qu'après lavage rapide on le pèse séché à poids constant, on constate que le poids varie entre 107 gr. et 114. La quantité d'alcali exprimée en soude, qui a été saturée par l'acide est donc de 3,44 en moyenne pour 100 cc. de bile.

Revenons au précipité biliaire.

De coloration jaunâtre et en même temps légèrement orange aussitôt après défécation, il change assez rapidement d'aspect;

en quelques heures il verdit à la surface, que celle-ci soit directement exposée au contact de l'air ou qu'elle reste recouverte d'eau, puis le vert vire au bleu. Douze heures suffisent pour que l'on rencontre les trois colorations superposées, bleue à la croute externe puis verte et jaune orangée. Si par brassage on renouvelle les surfaces, toute la masse est bientôt vert bleuâtre.

Après complet épuisement du précipité par l'eau distillée, on recueille l'ensemble des matières insolubles et on les dispose en couches minces sur des plats à l'étuve à 40°. La dessiccation complète demande environ 48 heures. On a alors une substance de coloration vert foncé, possédant des propriétés physiques spéciales : molle, pâteuse à chaud, elle se laisse étirer en fils soyeux et brillants ; à froid, au contraire, elle devient une résine sèche, cassante, friable. Sa saveur est légèrement amère. Au point de vue chimique elle possède une fonction acide, elle est, en effet, soluble dans les alcalis en donnant une liqueur verdâtre trouble, de laquelle les acides la précipitent.

On la soumet à une série de manipulations pour en séparer les substances étrangères quelle a entraînées mécaniquement.

1. *Matières grasses.* — Pour extraire les matières grasses, acides gras, graisses, cholestérines, lécithines, on essaie d'abord l'épuisement par le sulfure de carbone, de la matière pulvérisée. Mais sous cette forme de poudre, d'ailleurs difficile à réaliser, l'action dissolvante du CS₂ est extrêmement lente et nettement insuffisante. Malgré un contact prolongé et le renouvellement fréquent du solvant, on recueille un extrait très peu chargé. Si on opère à chaud, il se produit un ramollissement qui aboutit à une poix très consistante se prêtant mal à l'extraction.

On lui ajoute donc un faible volume d'acide acétique concentré, à peu près le dixième de son poids ; quelques minutes de chauffage au bain-marie suffisent pour obtenir un mélange homogène bien liquide. Dans ces conditions l'acide ne joue aucun rôle autre que celui d'un dissolvant. La liqueur

épaisse est versée dans un flacon à large goulot et agitée vigoureusement en présence de sulfure de carbone, le seul solvant qui ne donne pas d'émulsion persistante.

On sépare chaque fois le liquide d'épuisement par décantation. Le CS^2 doit être renouvelé une douzaine de fois.

La fin de l'extraction est indiquée lorsque le solvant sulfo-carbonique ne se colore plus en jaune orangé.

L'ensemble des liqueurs d'extraction est soumis aux recherches suivantes :

Après distillation du CS^2 on constate qu'il s'est déposé sur les parois du ballon des fines croutes jaune orangé. Reprises par de petites quantités de chloroforme elles s'y dissolvent lentement et donnent par évaporation lente de la solution chloroformique des cristaux classiques de bilirubine.

Dans le fond du ballon s'est rassemblée une substance brunâtre, onctueuse au toucher, d'odeur fade et écœurante. On la traite par une solution étendue de soude qui, en même temps, neutralise l'acide acétique entraîné. Il se fait une solution trouble à la surface de laquelle montent des graisses qu'on sépare après refroidissement. La liqueur est ensuite versée dans une boule à robinet et soumise à un bon épuisement éthéré, les autres solvants, chloroforme, CS^2 , ne peuvent être utilisés car ils provoquent des émulsions très tenaces.

L'extrait éthéré, coloré lui aussi en jaune orangé, prend très vite, après distillation de l'éther, la structure cristalline. On isole sur trompe les cristaux formés et on les lave avec de l'alcool méthylique. Ce sont de magnifiques lamelles que l'on purifie par des cristallisations dans l'éther. Leur point de fusion est $t = 145^\circ$ au bloc, il s'agit bien de cholestérines.

La liqueur alcaline aqueuse est acidifiée par l'acide chlorhydrique étendu et épuisée à l'éther.

L'extrait obtenu donne un sirop brunâtre qui cristallise en masse par évaporation lente du solvant. On le dissout dans de l'alcool méthylique légèrement aiguisé d'acide sulfurique et on le fait bouillir quelques instants au réfrigérant à reflux en présence de noir animal. Après filtration et concentration la

solution méthylique est abandonnée au froid. On obtient successivement plusieurs récoltes de belles aiguilles cristallines. Le point de fusion des premières est $t = 37^{\circ}$ au bloc MACQUENNE ; il s'abaisse notablement dans les dernières qui fondent à $t = 27^{\circ}$. Ce sont des mélanges d'acides gras.

Dans l'alcool restent toutes les substances amorphes que l'on sépare encore en deux groupes, après distillation de l'alcool, par un épuisement au sulfure de carbone.

On isole une quantité appréciable d'acide oléique que l'on caractérise par son sel de plomb soluble dans l'éther.

Le résidu est constitué par un poids très faible d'acides biliaires, passés en solution à la faveur de l'acide acétique.

2. *Acides biliaires et pigments.* — La masse acétique verdâtre, débarrassée des graisses, acides gras, cholestérines par épuisement au sulfure de carbone, contient les mucines, les pigments et les acides biliaires.

On la traite à chaud par le chloroforme ; il reste un faible insoluble que l'on décolore par plusieurs lavages à l'alcool fort ; ce sont les mucines ou pseudo-mucines.

La solution acéto-chloroformique est distillée dans le vide pour éliminer tout le CHCl_3 et une partie de l'acide acétique. On reprend par l'eau au bain-marie ; en renouvelant plusieurs fois celle-ci on chasse les dernières portions d'acide.

Le résidu neutre, est dissous dans un grand volume d'alcool méthylique puis soumis à la défécation barytique dans les conditions que nous préciserons ultérieurement.

La totalité des pigments verts passe à l'état de combinaison barytique insoluble, laissant une solution alcoolique incolore. Après distillation de l'alcool il reste un poids important de matière blonde, soluble dans les alcalis, insolubles dans les acides, molle et plastique à chaud, sèche et friable à froid. Cette substance représente la partie fondamentale de la bile, le gros faisceau des acides biliaires.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

EXEMPLE I. — 11 litres de bile de porc ont donné après repos 3 litres de dépôt boueux, et 9 litres 500 de liquide clair surnageant.

Ces 9 litres 500 ont été additionnés, par petites portions à la fois, de 380 grammes d'acide sulfurique dilués dans 1 litre d'eau.

La précipitation complète des matériaux organiques obtenue, on décante les eaux acides, puis on lave quatre fois la masse insoluble, jusqu'à réaction faiblement acide. L'ensemble des eaux forme un volume de 9 litres 450.

Cet extrait sulfurique est alors traité à chaud par de la baryte hydratée ; après lavages du SO^4Ba on évapore au bain-marie. Pendant la concentration, une grande partie des matières minérales se déposent progressivement. Le résidu contient avec ces mêmes sels une très faible proportion de bases.

Le poids de l'extrait sulfurique aqueux s'élève à 262 grammes.

Celui des matières basiques à environ 3 gr. 2.

L'extrait aqueux obtenu par plusieurs lavages du précipité biliaire forme un volume de 11 litres 200.

Concentré au bain-marie il abandonne 140 grammes de résidu dont la majeure partie est constituée par l'acide taurocholique (78 gr.).

La masse des acides biliaires, après dessiccation à l'étuve, pèse 704 grammes. On la traite au bain-marie par 100 grammes d'acide acétique fort de façon à faire une liqueur suffisamment fluide, que l'on épuise à l'aide de 11 litres de sulfure de carbone.

De l'extrait sulfo-carbonique on extrait de petites quantités de bilirubine, des graisses (6 gr. 50), un mélange d'acide gras cristallisés (12 gr.), des cholestérines (6 gr.), de l'acide oléique (27 gr.), et d'un peu d'acide glycocholique dissous par l'acide acétique.

L'insoluble dans le CS^2 est épuisé à chaud par le chloroforme. On isole ainsi les mucines qui, débarrassés du pigment vert, pèsent 4 gr. 2. Le poids des pigments précipités par le métholate barytique et libérés ensuite s'élève à 0,53.

Le résidu est constitué par l'acide glycocholique.

Si on rapporte ces résultats à 1.000 centimètres cubes de bile on obtient le tableau suivant :

Extrait aqueux acide.	29,1	: bases azotées, 3,5.
— aqueux	15,5	: acide taurochlorique, 8,6.
— sulfo-carbonique	5,7	{ graisses, 0,7.
		{ acide gras crist., 1,3.
		{ acide oléique, 3,1.
		{ cholestérines, 0,6.
		{ mucines, 0,4.
Précipité biliaire insoluble.	72,5	{ pigments, 0,05.
		{ acide glycocholique, 72,3

EXEMPLE II. — On part de 7 litres 500 de bile qui, après repos, donnent 4 litres 500 de liquide clair.

Ces 4 litres 500 de bile sont traités par 200 grammes d'acide sulfurique dilués dans 500 centimètres cubes d'eau.

On laisse déposer le précipité grumeleux; on décante la liqueur surnageante; puis on procède à cinq lavages successifs jusqu'à réaction voisine de la neutralité. Le volume des eaux acides est de 6 litres.

On élimine l'acide sulfurique par la baryte et on évapore à sec la solution aqueuse riche en matières minérales.

Poids de l'extrait sec = 136 grammes.

Bases azotées = 1,40.

L'extrait aqueux préparé par lavages du précipité biliaire donne un volume de 7 litres. Par concentration on isole 72 grammes de matière, dont 37 grammes d'acide biliaire soufré.

Après dessiccation à l'étuve à 400, le précipité des acides biliaires pèse 309 grammes. On lui ajoute à douce température 150 centimètres cubes d'acide acétique et on épuise au CS² avec 7 litres de ce solvant.

De l'extrait sulfo-carbonique on isole : graisses (3,40), acides gras cristallisés (6,5), cholestérines (4 gr.), acide oléique (15 gr.), enfin des traces de bilirubine.

Des acides biliaires le chloroforme libère les mucines (1,64), et le métholate barytique les pigments verts (0,25). On recueille 320 grammes d'acide glycocholique.

Rapportés à 1.000 centimètres cubes de bile, on a :

Extrait aqueux acide	30,2	: bases azotées, 0,3.
Extrait aqueux neutre	16,0	: acide taurocholique, 8,2.
Extrait sulfo-carboné	6,6	{ graisses, 0,7. acide gras crist., 1,4. cholestérines, 0,8. acide oléique, 3,2.
Précipité biliaire insoluble . .	71,1	{ mucines, 0,3. pigments, 0,04. acide glycocholique, 71.

Nous avons résumé dans le tableau suivant les résultats rapportés à 1.000 centimètres cubes de bile de plusieurs expériences :

Extrait aqueux acide	30,0	: bases, 0,32.
Extrait aqueux neutre	16,4	: acide biliaire soufré, 8,0.
Extrait sulfo-carbonique . . .	6,0	{ graisses, 0,7. acides gras cristallisés, 1,4. acide oléique, 3,0. cholestérines, 0,7.
Précipité biliaire insoluble . .	71,0	{ mucines, 0,4. pigments, 0,04. acide glycocholique, 72,3.

La méthode donne de bons résultats mais un peu faibles et cela pour deux raisons ; d'abord parce que la bile soumise à ce traitement n'est pas de la bile telle qu'elle provient de la vésicule ; en effet on ne prend que la partie liquide, le dépôt solide déjà mentionné plus haut et très riche en matières biliaires étant mis à part. En outre, comme dans toute précipitation, il se produit des entraînements d'ailleurs assez peu importants.

D'autre part l'emploi de réactifs acides, acide sulfurique et surtout acétique, favorise la transformation partielle des pigments orangés en pigments verts.

Enfin cette méthode n'est pas susceptible d'une application générale. Elle ne donne de résultats satisfaisants qu'avec des biles qui précipitent franchement par les acides minéraux, c'est-à-dire avec les biles riches en acides glycocholiques insolubles. La bile de porc seule, comme nous l'avons dit, peut être traitée ainsi ; au contraire la bile des autres animaux, en particulier du chien, des bovidés, des poissons, des oiseaux, sous l'influence des acides, donne un trouble laiteux, extrêmement difficile à séparer par décantation ou filtration. C'est que ces biles sont très riches en acide taurocholique dont la présence maintient en solution l'acide glycocholique ; en outre leur teneur assez élevée en mucines ou pseudo-mucines rend pratiquement impossible la précipitation par les acides.

CHAPITRE II

TECHNIQUE GÉNÉRALE APPLICABLE A TOUTES LES BILES

Nous avons recherché une méthode générale s'appliquant à toutes les biles, et nous avons choisi comme types celles de bœuf, de veau, de porc, de chien et de poisson (congre, *conger vulgaris*, Cuv.).

La bile de bœuf est extraite des vésicules biliaires provenant des abattoirs. Le volume de liquide contenu dans une poche biliaire oscille dans de très larges limites de 450 cc. à 900 et même 1300 cc. Au point de vue viscosité, on rencontre des variations considérables ; tantôt très faible, le plus souvent fortement accusée ; dans 15 0/0 des cas la viscosité est telle que la bile forme une seule masse, et qu'on ne peut en prélever une certaine quantité par simple décantation, il faut rompre la continuité du solide à l'aide d'instrument tranchant. Contrairement à l'opinion admise, il semble bien que le séjour dans la vésicule n'est pas la seule cause de la viscosité de la bile. La bile de bœuf est toujours parfaitement limpide, rarement elle tient en suspension des dépôts cellulaires ou des flocons fibrineux. Sur plusieurs milliers de vésicules examinées, nous avons constaté dans cinq cas la présence de caillots incolores formés de couches fibrineuses superposées et dans deux cas seulement celle de caillots riches en pigments biliaires rouge orangés.

Chez le veau la quantité de bile par vésicule est notablement inférieure ; 300 à 400 cc. dans les poches volumineuses, parfois à peine 150 cc. chez les animaux de petite taille. Elle est ordinairement limpide ; dans un seul cas pathologique que nous décrirons en détail, nous avons constaté la présence

de petits flocons muco-purulents chez un sujet atteint d'hépatite suppurée.

Le foie très hypertrophié présentait dans toute sa masse et surtout au niveau du lobe moyen plusieurs foyers purulents de la grosseur d'une noisette à celle d'une noix. Le contenu de chacun d'eux était constitué par du pus blanchâtre, très liquide, grumeleux, à odeur fétide; leur paroi était peu épaisse, irrégulière avec des diverticules s'enfonçant dans le parenchyme hépatique. L'examen bactériologique du pus a décelé la présence de staphylocoques et d'un bacille abondant, à bouts arrondis, ne prenant pas le Gram. Par cultures sur milieux solides, cette bactérie a été séparée des microbes de la suppuration. En bouillon peptoné elle cultive abondamment, le trouble est uniforme, l'odeur fécaloïde; le lait coagule en 36 heures, la gélose tournesolée vire au rouge au niveau des colonies. L'ensemble de ces caractères, et en outre la mobilité en bouillon nous ont permis de la faire rentrer dans le groupe du coli commune.

Il s'agissait donc d'une infection colibacillaire. Dans les flocons blanchâtres de la vésicule existait la même bactérie. Nous avons même pu suivre la marche de l'infection des voies biliaires en examinant le trajet du canal cholédoque; les parois étaient vivement enflammées avec de petites ulcérations à demi-recouvertes de fausses membranes. L'origine certaine de l'infection était donc l'intestin d'où elle avait gagné les voies biliaires et en même temps le parenchyme hépatique lui-même.

Chez les jeunes bovidés la bile est pauvre en mucus; on en juge déjà d'une façon très approximative par sa grande fluidité; ce n'est que dans l'âge adulte qu'elle acquiert une viscosité souvent si grande.

La bile du chien et du porc est très souvent trouble, tenant en suspension des débris cellulaires, des sédiments biliaires particuliers, mais presque jamais de flocons fibrineux ou purulents. Par simple repos d'ailleurs, ces matières se déposent et peuvent être éliminées. Faible viscosité surtout chez le porc.

La bile de congre (*conger vulgaris*, Cuv.) choisi comme type de poisson, a été recueillie, aux halles centrales, jour par jour, dans des flacons contenant quelques centimètres cubés de chloroforme et conservée à la glacière. Nous avons eu ainsi 5 litres de liquide. Cette bile a des caractères spéciaux.

Le volume de liquide contenu dans chaque vésicule est très

variable et dépend surtout de la taille des animaux ; tantôt on obtient à peine 30 cc. de bile, tantôt 100 et même 150 cc.

Alors que la bile de presque toutes les espèces est homogène, celle de congre contient fréquemment des masses solides, ovoïdes jaunâtres ou le plus souvent vert bleuâtre dont nous verrons plus loin la nature. Pendant le vidage des vésicules ces masses s'échappent et viennent tomber au fond de la partie liquide.

Dans une même vésicule il peut y en avoir plusieurs ; 12 o/o environ des vésicules en contiennent.

La bile liquide est peu visqueuse. Par contre les corps ovoïdes sont très onctueux et glissent des mains avec grande facilité. C'est pour leur formation que toute la mucine biliaire semble s'être condensée.

Les uns ont la grosseur d'une noisette, d'autres d'une noix, et même d'un œuf de poule ; à l'état humide leur poids varie de 15 à 90 gr. Dans le traitement de la bile, il importe de mélanger les deux parties, solide et liquide.

Au point de vue de la viscosité, les biles dont nous venons d'examiner rapidement les caractères les plus importants, peuvent être rangées en deux catégories :

Biles fluides (chien, porc et veau) ;

Biles visqueuses (bœuf, congre).

Toutes sont homogènes sauf la bile de congre.

La méthode générale de traitement comprend plusieurs opérations principales qui se succèdent dans l'ordre suivant :

Extraction des matières grasses ;

Préparation de l'extrait sec ;

Mucines et matières minérales ;

Séparation des pigments ;

Isolement des acides biliaires ;

Essai de séparation des acides glycocholiques et taurocholiques.

I. **Extraction des matières grasses.** — Il y a avantage à isoler la plus grande quantité possible des matières grasses :

graisses, acides gras, lécithines, cholestérines, par un traitement direct de la bile nature :

Parmi les solvants usités dans le laboratoire, le tétrachlorure de carbone, la benzine, le chloroforme ne peuvent être employés parce qu'ils font avec la bile des émulsions tenaces ; le sulfure de carbone, l'éther de pétrole et surtout l'éther sulfurique n'offrent pas cet inconvénient au même degré.

1. *Biles fluides.* — Ces biles peuvent être soumises telles qu'elles à l'épuisement par l'éther. On prend un volume connu de bile, 500 cc. par exemple, qu'on introduit dans une boule à robinet et auquel on ajoute 200 cc. d'éther. On ferme et on agite d'abord lentement en ouvrant le robinet pour permettre l'échappement de l'air, puis plus fortement sans aller jusqu'à une émulsion trop fine. Par repos l'éther peu à peu monte au-dessus de la bile entraînant avec lui une certaine quantité de matières grasses ; en même temps il dissout des traces de bilirubine libre. La coloration jaune safran que prend le solvant indique la présence de ce pigment que l'on isole aisément en évaporant l'éther. Sur les parois du récipient où se fait l'évaporation se dépose très vite à cause de son insolubilité, un fin précipité jaune orangé qui, repris par du chloroforme, cristallise en micro-cristaux classiques de bilirubine. Une première extraction achevée on fait écouler la bile en séparant à l'aide du robinet la couche éthérée.

On renouvelle l'éther et on agite à nouveau le mélange bile-éther.

La même opération est pratiquée cinq à six fois en moyenne. On est averti de la fin de l'épuisement lorsque l'éther n'abandonne par distillation qu'un résidu négligeable.

Avec les biles de veau et de chien, qui sont toujours limpides et peu visqueuses, l'extraction des matières grasses s'effectue sans difficulté ; s'il se fait au début une émulsion un peu persistante on parvient à la rompre par addition d'un plus grand volume d'éther sulfurique ou d'éther de pétrole.

La bile de porc exige plus de précautions parce qu'elle tient très souvent en suspension des flocons fibrineux ou des pré-

cipités biliaires; aussi une agitation un peu vive en présence d'éther détermine la production d'émulsion tenace. On évite cet inconvénient en ajoutant à la bile un tiers ou même un quart de son volume d'eau distillée. On diminue ainsi la viscosité et on rend le liquide homogène par dissolution des substances biliaires.

2. *Biles visqueuses.* — Les biles muqueuses ne peuvent être traitées directement par l'éther. En effet, ce solvant se mêle très difficilement à la bile et quand le mélange est réalisé, il est impossible de le faire cesser ni par addition d'eau, d'éther, d'éther de pétrole, ni même par centrifugation.

Cependant la partie liquide de la bile de congre serait justifiable de l'extraction éthérée.

Quoiqu'il en soit aussi bien pour la bile de bœuf que pour celle de poisson il est préférable de recourir à un procédé détourné. On mesure un volume donné de liquide qu'on verse dans une large capsule et qu'on concentre à sec au bain-marie en terminant à l'étuve à 40°. L'extrait est repris par de l'alcool méthylique et après distillation de celui-ci par un volume d'eau distillée égal au volume primitif de bile. Les mucines se trouvent ainsi totalement insolubilisées. C'est cette nouvelle solution qui est traitée dans les mêmes conditions que plus haut.

Les éthers d'extraction, pour chaque bile, sont réunis puis distillés; on obtient un extrait de poids différent suivant les espèces, auquel il faut ajouter les petites quantités de matières grasses qui se trouvent séparées au cours des manipulations ultérieures.

	Volume de bile	Poids de l'extrait éthéré
Chien . . .	1.000 centimètres cubes	11
Porc. . . .	—	18
Veau . . .	—	5
Bœuf . . .	—	6
Congre . . .	—	7

A chaque extrait correspond une odeur qui rappelle l'animal dont il provient. L'extrait de chien est fade, écœurant, celui de congre sent désagréablement l'huile de foie de morue.

C'est d'ailleurs une règle générale en biologie ; chaque espèce animale possède une odeur particulière qui se retrouve dans les sécrétions, les tissus, mais qui se localise plus particulièrement dans les graisses.

Le résidu éthéré est additionné d'eau alcaline qui dissout les acides gras et les savons ; un épuisement à l'éther enlève les graisses restées insolubles.

On acidifie alors pour libérer les acides gras de la bile, et les acides des savons alcalins, puis on traite à nouveau par l'éther qui dissout les acides gras et les cholestérines.

Cette solution éthérée est soumise à une distillation incomplète ; les dernières portions d'éther, par évaporation lente, abandonnent à l'état cristallisé les cholestérines et une partie des acides gras cristallisables. Le résidu est alors versé sur filtre à succion et arrosé lentement avec de l'alcool méthylique. On sépare de cette façon presque la totalité des cholestérines à l'état de belles lamelles nacrées dont le point de fusion est $t = 145^{\circ}$, seul caractère fixe bien connu actuellement.

La solution méthylique a dissous les acides gras. On la concentre légèrement au bain-marie en présence de noir animal. Après filtration on laisse évaporer lentement au froid. Il se dépose, en plusieurs fois, des aiguilles cristallines d'acides gras.

Les acides gras à point de fusion très bas, ainsi que l'acide oléique restent en solution.

On parvient ainsi à séparer d'une façon satisfaisante l'extrait éthéré en quatre groupes ; graisses neutres, cholestérines, acides gras cristallisables et non cristallisables.

1.000 centimètres cubes de bile de porc donnent	{	graisses neutres, 9,5. cholestérines, 0,85. acides gras cristallisables, 3. acides non cristallisables, 4.
1.000 centimètres cubes de bile de chien donnent	{	graisses neutres, 6,5. cholestérines, 0,67. acides gras crist., 2,30. acides non crist., 0,90.

II. Extrait sec. — La bile débarrassée d'une partie des matières grasses est recueillie dans de larges plats en porcelaine puis exposée à l'air pour permettre le départ de l'excès d'éther. On porte alors au bain-marie bouillant. Il faut environ 50 à 60 heures pour amener un litre de bile dégraissée à consistance sirupeuse. A partir de ce moment il est nécessaire de brasser la masse de façon à renouveler les surfaces; en effet, les parties profondes gardent l'eau avec ténacité. Bientôt même la dessiccation ne progresse pas, l'eau perdue par le sirop biliaire est remplacée par la vapeur d'eau provenant du bain-marie.

On achève l'opération à l'étuve à 40°, en modifiant plusieurs fois les surfaces.

On obtient alors une masse sèche, cassante, se réduisant aisément en poudre. Blond jaunâtre chez le porc, elle est brun foncé chez le chien, verdâtre ou brunâtre chez le bœuf et rappelle d'assez près la couleur de la bile liquide. Aussitôt elle doit être recueillie et mise au sec, en flacons bien bouchés, car elle est très hygroscopique. Cette matière constitue l'extrait sec biliaire dégraissé.

Le poids varie très nettement suivant les espèces.

	Volume de bile évaporée	Extrait sec dégraissé partiellement
Chien . . .	1.000 centimètres cubes	229
Porc . . .	—	137
Veau . . .	—	106
Bœuf . . .	—	107
Congre . . .	—	143

La bile de chien est donc la plus chargée en résidu sec, tandis que celle des bovidés est la plus pauvre.

III. Mucines ou pseudo-mucines. — En attendant que l'on connaisse d'une façon exacte la nature chimique de ces substances nous avons dû les séparer. L'extrait sec est traité par l'alcool méthylique fort qui dissout les sels biliaires, les pigments, les matières grasses qui ont échappé à l'épuisement

éthéré et abandonne les mucines, les débris cellulaires non éliminés par repos, et une grande partie des substances minérales.

L'opération se fait au bain-marie; on introduit dans un ballon d'un litre et demi un poids connu d'extrait sec environ 100 grammes réduit en poudre, ou simplement cassé en petits fragments. On ajoute 500 grammes d'alcool méthylique et on relie à un réfrigérant ascendant. En quelques minutes toutes les matières solubles ont passé dans le solvant; il ne reste que des flocons jaunâtres ou brun verdâtre qui nagent dans la liqueur et au fond du ballon des sels minéraux.

On cesse de chauffer; après repos on verse sur filtre à suction la partie du liquide clair encore chaud, puis le dépôt floconneux des substances insolubles. On lave la partie filtrée tant que les alcools de lavage se colorent.

L'ensemble des alcools, formant un volume de un litre à un litre et demi, est réuni pour un traitement ultérieur.

La matière insoluble est recueillie séchée et pesée. On obtient les chiffres suivants :

	Volume de bile	Poids des substances insolubles
Chien . . .	1.000 centimètres cubes	6,3
Porc. . . .	—	9,3
Veau . . .	—	4,66
Bœuf . . .	—	11,3
Congre . . .	—	7,2

C'est donc la bile des bovidés adultes qui est la plus riche en mucus, mais à ce point de vue, il existe des variations assez grandes suivant les échantillons aussi bien pour la bile de cet animal que pour celle de congre. Au contraire la viscosité est à peu près toujours la même chez le chien, le porc et le veau.

La partie insoluble dans le méthanol change très vite de couleur, par dessiccation elle devient brun foncé. Malgré de nombreux lavages elle retient toujours de petites quantités de pigments, en particulier de bilirubine, comme permet de le constater un épuisement au chloroforme.

Les sels minéraux solubles qui accompagnent les mucines sont séparés par un traitement de celles-ci à l'eau distillée.

On constate en même temps que l'insolubilité des mucines n'est que relative. En effet, dans une expérience faite sur la bile de chien qui nous avait donné 2 gr. 3 de mucines, nous sommes parvenus à redissoudre dans l'eau 0,3 de matière. Une demi-heure de chauffe au bain-marie a suffi pour obtenir après filtration une liqueur brune qui par évaporation à sec a abandonné une mince croûte sèche, cassante et transparente. Brûlée sur lame de platine cette substance donnait un charbon foisonnant et répandait une odeur de corne brûlée comme les substances albuminoïdes. C'est donc une proportion de 13 o/o qui est restée soluble malgré les déshydratations successives, par dessiccation et par lessivage à l'alcool fort.

IV. Pigments biliaires. — La liqueur méthylique est alors additionnée à l'ébullition de métholate de baryum pour précipiter l'ensemble des pigments ; pigments orangés ou verts.

Jusqu'à présent le méthanolate de baryum était un produit de collection, de laboratoire. MM. ETARD et A. VILA, en ont fait un réactif courant en chimie biologique. Ils ont été conduits à cela par la considération suivante ; c'est que les mêmes réactions peuvent se passer d'une façon toute différente dans des milieux différents. Par exemple dans un milieu aqueux telle combinaison peut se comporter autrement que dans un milieu alcoolique, c'est-à-dire anhydre. Il faut donc des réactifs adaptés aux milieux. Le méthanolate de baryte est précisément un réactif destiné à être employé en milieu anhydre.

On le prépare d'après la technique des auteurs : de la baryte caustique est finement pulvérisée au mortier recouvert de papier ou d'un linge pour éviter les poussières très irritantes, puis mise dans un flacon contenant de l'alcool méthylique anhydre et on bouche. On emploie 10 grammes de baryte pour 100 cc d'alcool. On agite fréquemment le mélange et on

filtre après 24 heures. La liqueur barytique doit être conservée avec soin à l'abri de toute humidité.

L'alcool méthylique s'est saturé de baryte ; il contient environ 6 o/o de baryum, sous forme de $(\text{CH}_3\text{O})^2\text{Ba}$.

L'emploi de ce réactif que nous avons utilisé pour la défécation des pigments se fait de la façon suivante :

La liqueur méthylique contenant les pigments et les sels biliaires est versée dans un ballon relié au réfrigérant ascendant ; un tube à brome est adapté au col de ce ballon. On porte à l'ébullition, au bain-marie, la liqueur à traiter et on y fait tomber goutte à goutte du méthanolate de baryum. Chaque goutte de réactif détermine la formation d'un précipité floconneux jaune brun. On continue jusqu'à ce qu'il ne se fasse plus qu'un très faible précipité et que la liqueur soit devenue à peu près incolore. Si on suit au tournesol la marche de l'expérience on constate l'apparition d'une réaction alcaline bien avant que la précipitation soit achevée.

Partant d'une liqueur légèrement acide, on arrive assez vite à neutralité puis à une réaction faiblement alcaline qui se maintient ainsi longtemps. Ce n'est que quand la précipitation est à peu près complète que le tournesol bleuit fortement.

La liqueur est alors laissée au repos ; le précipité se rassemble lentement au fond du ballon. On décante la solution claire et on retient le précipité sur filtre. Après lavage à l'alcool on le recueille et sèche sur vide sulfurique.

On obtient avec les diverses biles les résultats suivants :

	Volume de bile	Poids du précipité pigmentaire de défécation barytique
Chien . . .	1.000 centimètres cubes	11
Porc. . . .	—	7
Veau . . .	—	5,3
Bœuf . . .	—	6,2
Congre . . .	—	8,5

On remarque qu'au cours de l'addition du métholate de baryum, une partie du précipité qui se forme, se redissout

aussitôt. C'est que le réactif précipite, en même temps que les pigments, des sels biliaires, dont les sels de baryum sont solubles à chaud dans un excès d'alcool méthylique. Il ne reste donc, en gros, d'insoluble que les pigments qui sont entraînées par le baryum. Il s'agit d'une véritable défécation pigmentaire en milieu anhydre, alcoolique.

Le produit après dessiccation est traité en vue de l'isolement des pigments qu'il contient. Pour cela on le pulvérise et on le met en contact quelques instants avec une solution à 10 o/o environ d'acide chlorhydrique. Le baryum combiné se dissout à l'état de BaCl^2 et libère les pigments qui sont filtrés, lavés et séchés. On peut alors séparer les deux pigments principaux verts et orangés.

Par un épuisement à l'alcool méthylique ou éthylique on dissout la biliverdine et ses dérivés. Quand l'alcool ne se colore plus on traite par le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone. La bilirubine passe dans ces colorants ou on peut la caractériser par le chlore, le brome ou l'iode et desquels l'isolement par cristallisation est aisé.

Sauf dans la bile de congre, nous avons constaté la présence des deux sortes de pigments. La bile de chien est particulièrement riche en bilirubine ainsi d'ailleurs que celle de porc quoiqu'à un moindre degré. Les biles de bœuf et de veau contiennent surtout des pigments verts.

C'est surtout à l'état de sel alcalin que la bilirubine se trouve au moment de la précipitation par le métholate de baryum.

On sait en effet que la bilirubine libre est très peu soluble dans l'alcool ; aussi pendant l'épuisement méthylique de l'extrait sec biliaire, ce pigment reste-t-il en très grande proportion dans la partie insoluble.

Le sort de la bilirubine libre est donc assez complexe dans notre technique. Une faible quantité est enlevée en même temps que les matières grasses au moment de l'épuisement par l'éther de la bile nature ; une autre portion beaucoup plus importante subit des modifications d'ailleurs encore inconnues

pendant l'évaporation de la bile au bain-marie puis à l'étuve. Il ne passe donc en solution alcoolique que les bilirubinales alcalins.

Le pigment vert qui ne paraît pas exister à l'état libre, accompagne le pigment orangé et se trouve déféqué en même temps que lui par le métholate de baryum.

V. Sels biliaires. — La solution méthylque biliaire privée de ses pigments est débarrassée d'alcool par distillation poussée à l'état de sirop à l'aide du vide. On reprend par un faible volume d'eau distillée; par repos montent à la surface de la solution chauffée quelques instants au bain-marie, de fines particules graisseuses. On les sépare et on achève l'épuisement par de l'éther; ces matières grasses doivent être jointes aux premières.

La liqueur biliaire légèrement alcaline par le baryte est carbonatée à refus puis soumise à l'ébullition pour précipiter le carbonate de baryte, filtrée et évaporée à sec au bain-marie et à l'étuve à 40°.

On isole ainsi la totalité des sels biliaires.

Voici les chiffres obtenus pour les différentes biles.

	Volume de bile	Poids des sels biliaires
Chien	1.000 centimètres cubes	197
Porc.	—	120
Veau	—	91
Bœuf	—	92
Congre	—	128

Ces sels se présentent sous la forme de masse cassante, friable, facile à réduire en poudre, de couleur blonde, de saveur à la fois amère et sucrée et d'odeur légèrement fade. Sous cette forme ils peuvent être employés pour certains usages thérapeutiques et biologiques.

Au point de vue thérapeutique il y aurait grand avantage scientifique à en substituer l'usage aux nombreuses préparations de bile séchée avec toutes ses impuretés.

Ils ne sont pas moins intéressants au point de vue biologique. Tout récemment, en effet, les bactériologistes ont montré que le bacille d'EBERTH pousse plus activement dans un milieu biliaire que le *bacterium coli*. Ils (1) ont recommandé comme milieu de culture, un bouillon peptone-gélose additionné de bile nature et de colorants (tournesol, vert malachite). Or la présence de la bile offre deux graves inconvénients : le premier tient à la couleur naturelle de la bile qui masque le virage des réactifs colorants, le deuxième est dû à la présence des sels minéraux et peut-être d'acides gras qui se déposent sous forme d'efflorescences par suite d'une dessiccation partielle à l'étuve à 37°. On éviterait ces imperfections en utilisant les sels biliaires tels qu'ils sont préparés par notre méthode.

VI. Séparation des sels biliaires. Historique. — La séparation des sels biliaires est une question des plus difficiles et loin d'être résolue encore malgré les recherches longues, patientes des savants, chimistes ou physiologistes.

On admet avec tous les classiques qu'il existe deux grands groupes d'acides biliaires, les acides soufrés (taurocholiques) et les non soufrés (glycocholiques). Il est possible également que chacun d'eux soit complexe et qu'il y ait plusieurs acides taurocholiques et glycocholiques et même selon nous des acides mixtes. Ce n'est d'ailleurs pas là une simple hypothèse; elle est basée en particulier, pour les acides soufrés, sur de réelles différences de propriété vis-à-vis des réactifs chimiques. Formulée déjà par TENGSTRÖM, cette conception tend à s'acréditer en physiologie.

Quoi qu'il en soit, la classification établie par STRECKER (2) conserve provisoirement toute sa valeur. Les divers acides glycocholiques donnent par hydrolyse du glyocolle et un noyau cholalique, les acides taurocholiques de la taurine et un noyau cholalique voisin du premier.

(1) DUNSCHMANN, *Annales Institut Pasteur*, p. 48, 1909.

(2) STRECKER, *Liebig's Ann. Chem. Pharm.*, 65, 9.

Il faut donc avant toute recherche étudier et réaliser des méthodes de séparation de ces deux grandes familles. Alors seulement il sera possible de pénétrer plus avant dans la question et d'établir si chaque groupe est simple ou complexe.

Les premières recherches faites dans cette voie sont dues à STRECKER.

Cet éminent chimiste employait les sels de plomb pour obtenir la séparation des acides glycocholiques et taurocholiques. Il remarqua qu'une solution de glycocholate de soude précipite lorsqu'on l'additionne d'acétate de plomb et qu'au contraire le taurocholate alcalin reste dans la solution. Pour obtenir la précipitation du sel soufré il faut faire réagir l'acétate de plomb en liqueur légèrement ammoniacale.

Il partait d'une solution de bile cristallisée obtenue par la méthode de PLATTNER, et la précipitait avec l'acétate neutre de plomb. Dans la liqueur filtrée et séparée de ce précipité il déterminait une deuxième précipitation au moyen d'acétate basique de plomb. Les deux précipités plombiques étaient lavés, séchés et dissous dans l'alcool. Cette solution était débarrassée du plomb par l'hydrogène sulfuré. Après distillation de l'alcool il obtenait séparément les deux acides biliaires.

Cette méthode est restée la seule classique jusqu'aux recherches de TENGSTRÖM, malgré sa valeur très relative. STRECKER d'ailleurs a reconnu que le précipité isolé par l'acétate basique de plomb n'avait pas une composition constante et qu'il était toujours mélangé de glycocholate de plomb.

Il ne put isoler de la bile de bœuf l'acide taurocholique à l'état de pureté. Il ne parvint à en établir l'existence et la formule que par une voie très indirecte.

Connaissant les produits d'hydrolyse du glycocholate alcalin il soumit à une hydrolyse barytique aqueuse les sels de plomb des deux acides et obtint avec la même résine (acide choléique) un mélange de taurine et de glycocolle. Il conclut

donc que l'acide soufré de la bile est une combinaison d'acide choléique et de taurine.

Une seconde méthode de séparation des sels biliaires est basée sur les différences de solubilité de chacun des acides. L'acide glycocholique est relativement très peu soluble, au contraire l'acide taurocholique l'est à un très haut degré. Dans une solution aqueuse des deux sels on ajoute une solution étendue d'acide chlorhydrique ou sulfurique, l'acide glycocholique précipite en gros flocons blancs, on le lave, on le filtre et sèche. Dans la liqueur doit se trouver seul l'acide biliaire soufré.

La technique est simple mais donne des résultats très imparfaits. Il se produit en effet des phénomènes importants de dissolution et d'entraînement d'un acide par l'autre ; avec l'acide glycocholique précipité de l'acide taurocholique, et ce dernier maintient en solution une partie du premier.

HAMMARSTEN a proposé une dernière méthode de séparation des sels biliaires basée sur les expériences de son élève TENGSTRÖM.

TENGSTRÖM (1) a, en effet, effectué une longue série de travaux dans cette voie. Il a d'abord éprouvé la méthode de STRECKER sur l'emploi des sels de plomb.

Etant donné un mélange de sels biliaires il en prend trois échantillons et les traite par l'acétate neutre de plomb, l'acétate de plomb en solution acétique, enfin par l'acétate en solution ammoniacale.

Le précipité obtenu dans les trois cas est recueilli, mis à chaud en digestion avec du carbonate de soude. On évapore, on reprend par l'alcool qui entraîne seulement la matière organique, puis on sèche.

Le résidu sec est alors calciné en présence d'un mélange de KOH et de AzO^3K pour oxyder le soufre qu'on pèse à l'état de SO^*Ba . Du poids de soufre on calcule le pourcentage en acide taurocholique.

(1) TENGSTRÖM, *Zeitschrift für physiol. Chem.*, vol. XLI.

	Poids de taurocholate précipité 0/0	
	I	II
L'acétate neutre de Pb donne	37,9	29,6
— de Pb acétique donne	64,3	67,8
— — ammoniacal donne	71,5	74,2

Ce sont des variations très notables, variations du reste signalées par STRECKER lui-même.

L'emploi des sels de plomb ne peut donc être conservé que comme une méthode de pis-aller ou d'approximation très médiocre.

TENGSTRÖM, après un grand nombre d'expériences, conclut que dans un mélange de taurocholates et de glycocholates, les premiers empêchent ou gênent beaucoup la participation des seconds.

Il porta donc ses efforts vers la recherche des réactifs capables de précipiter le moins de glycocholates possible en présence de taurocholates et obtint les résultats suivants :

Sulfate de cuivre précipite dans un mélange 20 o/o de glycocholate			
Nitrate d'argent	—	15	—
Acétate de plomb	—	15	—
Alun de potasse	—	10	—
Alun de fer	—	10	—
Perchlorure de fer	—	1	—

Bien que chacun de ces sels puisse donner avec la bile nature un résultat différent de celui constaté sur les acides biliaires séparés, TENGSTRÖM adopte le Fe^2Cl^6 comme étant le meilleur réactif de séparation.

Il fait donc des essais sur le perchlorure de fer.

Il part de 25 gr. de bile décolorée dont il fait une solution étendue ; par addition d'une solution aqueuse de Fe^2Cl^6 à 5 o/o il obtient un précipité biliaire.

Le fer, à la fois dans la liqueur et le précipité, est éliminé par digestion à chaud avec du carbonate de soude. Après neutralisation exacte du Co^3Na^3 en excès par HCl , on évapore à sec et on obtient ainsi les sels alcalins biliaires ; d'une part

le sel précipité par Fe^2Cl^6 et d'autre part celui qui est resté en solution.

On dose le S dans les deux et on en tire toujours par le calcul de ce seul élément, c'est-à-dire par une méthode purement reflexe, la proportion de taurocholate dans chacun d'eux.

Les dosages indiquent que le précipité obtenu par Fe^2Cl^6 contient 84,4 o/o de taurocholate (avec les sels de plomb on arrive seulement à 72,8 o/o).

Le sel resté dissous contient environ 5,9 de sel biliaire soufré.

Non satisfait de ces résultats, TENGSTRÖM pense qu'il vaut mieux précipiter d'abord tout le glycocholate par l'alun de potasse, puis ajouter Fe^2Cl^6 pour entraîner le taurocholate jusqu'à l'état de pureté.

Il prend donc 25 gr. de bile décolorée, lui ajoute d'abord 5 o/o d'alun de potasse. Dans la liqueur débarrassée d'alun par Co^3Na^2 dont l'excès sera saturé exactement par HCl , il verse la solution de Fe^2Cl^6 .

Il obtient ainsi deux précipités : un premier par addition d'alun, l'autre par le perchlorure de fer. Ces deux précipités sont mis à digérer à chaud avec du carbonate de soude pour éliminer l'alumine et l'oxyde de fer, puis séchés, repris par l'alcool et de nouveau concentrés à sec. La liqueur non précipitée par l'alun et le perchlorure de fer est débarrassée également de ces réactifs par le même procédé et traitée de la même façon.

La recherche du soufre par calcination en présence de KOH et de AzO^3K donne pour les trois parties :

	p. 100 de sels biliaires	p. 100 de taurocholate
Précipitation par alun	32	42
— chlorure ferrique	17,6	40,7
Non-précipitation	38	87,8

Cette méthode donne donc de meilleurs résultats, mais ils sont loin d'être satisfaisants ; en effet d'une part dans la dernière portion qui contient 87,8 o/o de sel soufré il y a encore

12 o/o d'impuretés, et d'autre part l'emploi du chlorure ferrique exige des précautions ; en effet un excès de réactif peut redissoudre le précipité obtenu par lui-même. Quoi qu'il en soit, c'est à cette technique que TENGSTRÖM s'arrête, bien qu'il en reconnaisse l'impuissance au point de vue de la pureté et surtout du rendement (en partant de 60 gr. de sels biliaires, on sépare avec peine 15 gr. de substance contenant 95 o/o de taurocholate).

Tels sont les résultats obtenus en traitant des sels biliaires isolés et débarrassés des impuretés qui les accompagnent dans la bile.

Ils deviennent encore moins sûrs lorsqu'il s'agit de la bile elle-même. Aussi TENGSTRÖM conseille-t-il une série d'essais suivant les espèces animales ; d'après lui, tantôt il y aura avantage à traiter directement la bile par du chlorure de sodium à saturation (nous y reviendrons à propos des acides taurocholiques) tantôt par l'alun de potassium puis par le $\text{Fe}^{\circ}\text{Cl}^6$, suivi de chlorure de sodium, enfin dans certains cas par l'acétate de plomb, le perchlorure de fer et le NaCl .

HAMMARSTEN (1) dans ses recherches sur les taurocholates biliaires s'est servi des données expérimentales de son élève en précisant les détails de technique pour chaque bile.

Toutes les méthodes de séparation des sels biliaires ne donnent donc que des résultats incertains. En outre le contrôle des substances séparées est basé sur le seul dosage d'un élément, du *soufre*, sur lequel les auteurs s'appuient pour calculer la teneur en taurocholate d'une mélange biliaire.

Selon nous, et nous insistons à nouveau sur ce point ; cette induction par le calcul n'offre pas toutes les garanties scientifiques suffisantes surtout lorsqu'il s'agit de composés amorphes et dont le poids moléculaire est aussi élevé que celui des sels biliaires.

Enfin nous ferons remarquer qu'en ce qui concerne les acides biliaires isolés de leurs sels de plomb par l'hydrogène

(1) HAMMARSTEN, *Zeitschrif fur physiolog. Chem.*, vol. XLIII.

sulfuré (STRECKER), une sulfuration est possible. On sait, en effet, que H^2S se fixe volontiers sur les substances organiques complexes. M. ETARD a constaté qu'en libérant par H^2S de sa précipitation plombique, une chlorophylle, celle-ci avait absorbé jusqu'à 3 o/o de soufre.

Il nous a paru qu'il serait plus exact pour apprécier rigoureusement les proportions relatives des deux sels biliaries, ou seulement la quantité de l'un d'eux, d'isoler et de peser les groupes bien connus, taurine ou glyocolle.

C'est ce point que nous allons examiner rapidement avant d'aller plus loin dans l'étude de la séparation des sels biliaries.

VII. Mélanges des sels biliaries. Proportion de chacun d'eux déterminée par la méthode hydrolytique acide. — Nous avons préféré l'hydrolyse par les acides à l'hydrolyse par les alcalis ou les alcalino-terreux.

Nos recherches ont porté sur les biles riches en taurocholates : biles de bœuf, de veau, de chien et de congre.

L'acide employé a été l'acide sulfurique.

Les sels biliaries sont dissous dans un grand volume d'eau distillée ; pour 100 grammes de matière on utilise 2 litres d'eau ; le chauffage au bain-marie hâte la dissolution. On ajoute alors la quantité de SO^4H^2 nécessaire pour saturer les alcalins combinés aux acides biliaries en dépassant très légèrement cette limite de façon à obtenir une réaction nettement acide au tournesol. Dans ces conditions la liqueur se trouble à peine ; un excès d'acide, au contraire, provoquerait une précipitation massive d'acides biliaries, circonstance très défavorable à l'hydrolyse.

On chauffe alors, au bain d'huile entre 130° et 135° , la liqueur ainsi préparée, mise dans un ballon relié à un réfrigérant à reflux. Le léger précipité formé à froid diminue bientôt et la solution devient limpide. Après 1 heure de chauffe environ, on voit apparaître à la surface de petites gouttes huileuses qui s'étalent et dont la coloration est brunâtre. Bientôt ces gouttes se réunissent et forment de très petites

masses pâteuses, qui tombent au fond pour être ramenés à la surface à chaque soubresaut du liquide en ébullition. Quand le précipité n'augmente plus ce qui a lieu au bout de 2 heures, on ajoute une nouvelle quantité d'acide sulfurique dilué qu'on verse avec précaution par l'intermédiaire du réfrigérant. De nouveau on chauffe tant qu'il se fait un précipité. On verse un dernier volume d'acide, la teneur en SO^4H^2 devant s'élever à 5 o/o de la liqueur totale. La chauffe est combinée jusqu'à ce que l'hydrolyse soit achevée.

L'opération pour des quantités de matières voisines de 100 grammes exige environ 8 à 10 heures. Lorsqu'elle est terminée, le contenu du ballon est formé d'une liqueur claire à peine colorée en brun et d'une masse blonde rassemblée au fond.

Sèche, cassante, friable à froid cette matière se ramollit à chaud et devient malléable, facile à étirer en filaments soyeux ; elle représente le noyau fondamental des acides biliaires, les acides cholaliques. Elle est recueillie, pulvérisée, lavée à neutralité et séchée.

Les eaux d'hydrolyse sont débarrassées d'acide sulfurique libre ou combiné, par la baryte. On reste sur légère acidité minérale. Les sulfates de baryte sont filtrés sur trompe et lavés plusieurs fois.

Toutes les eaux sont alors évaporées au bain-marie. Pendant la concentration il se fait souvent un faible précipité de matière résineuse brunâtre, qui paraît être un produit hydrolytique accessoire et que nous n'avons pu étudier à cause de son peu d'importance. On filtre pour l'éliminer.

Par évaporation et refroidissement il se dépose des cristaux de matières minérales, en particulier de sulfate de soude, qui est rejeté, puis la taurine en prismes allongés, enfin le glyco-colle en prismes courts et trapus accompagnés de SO^4Na^2 et NaCl .

La séparation de ces deux acides amidés d'avec les sels minéraux est faite, sur filtre à succion, par lessivage à l'eau distillée. Les sels beaucoup plus solubles passent très vite en solution. On reprend la partie restée sur filtre et on la soumet à plusieurs recristallisations.

La séparation de la taurine et du glyocolle est obtenue grâce à leur différence de solubilité dans l'eau ; la première étant moins soluble que le second. En outre dans les queues de cristallisations des solutions mères, les deux sortes de cristaux sont faciles à isoler les uns des autres.

Cette technique ne peut être appliquée aux biles riches en glycocholates, dont le type est la bile de porc. En présence d'acide minéral l'acide biliaire précipite en totalité et par suite se trouve soustrait à l'hydrolyse. Il faut avoir recours aux alcalis ou aux alcalino-terreux.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

Bœuf. — 1° 215 grammes de sels biliaries préparés par notre méthode générale sont dissous dans 2 litres 500 d'eau distillée.

On répartit dans deux ballons reliés au réfrigérant ascendant et on porte à l'ébullition au bain d'huile (130 à 135°). On ajoute alors au cours de l'hydrolyse 130 grammes de SO^4H^2 pur dilué dans 300 centimètres cubes d'eau.

L'hydrolyse a donc lieu progressivement. Après 15 heures de chauffe tout l'acide cholalique se trouve précipité.

On filtre pour séparer les eaux d'hydrolyse que l'on neutralise par la baryte en restant sur très légère acidité sulfurique.

La concentration des eaux est faite au bain-marie, il se dépose d'abord d'abondants cristaux de SO^4Na^2 , puis un mélange de taurine et de glyocolle, mêlé de NaCl et de SO^4Na^2 .

Par reprise de cette dernière portion on sépare bien nettement du glyocolle la taurine moins soluble et dont les cristaux sont faciles à reconnaître.

Dans cette expérience nous avons obtenu :

Taurine cristallisée	4,43
Glyocolle cristallisé	1,92

2° Dans un deuxième cas, on a mis en attaque, dans les mêmes conditions, 100 grammes de sels biliaries.

On a séparé :

Taurine cristallisée	2,07
Glyocolle cristallisé	0,89

La proportion de taurine par rapport au glyocolle s'élève donc à 70 0/0 environ.

Veau. — 1° On part de 37 grammes de sels biliaires secs.

On dissout dans 500 centimètres cubes d'eau et on chauffe au bain d'huile à l'ébullition.

On ajoute en trois fois 25 grammes de SO^4H^2 dilué dans 100 centimètres cubes d'eau.

L'opération dure 8 heures.

Le cholalique recueilli et séché pèse 24 grammes.

On défèque l'acide sulfurique par la baryte. Les jus d'hydrolyse sont concentrés progressivement en séparant les sels minéraux.

Après plusieurs cristallisations on sépare 1,987 de taurine cristallisée.

Nous n'avons pu constater la présence de glyocolle ni isoler ce corps si aisé à reconnaître et à caractériser.

2° 80 grammes de sels biliaires sont hydrolysés dans une liqueur contenant 1.000 centimètres cubes d'eau et 55 grammes de SO^4H^2 .

On obtient 4 gr. 26 de taurine cristallisée, mais pas de glyocolle, de même que dans l'opération précédente.

Chien. — 1° On prend 23 grammes de sels biliaires.

On dissout dans 700 centimètres cubes d'eau et on chauffe au bain d'huile à 130°.

Pendant l'ébullition on ajoute lentement et, à plusieurs reprises, 60 grammes de SO^4H^2 étendu de 100 centimètres cubes d'eau.

L'hydrolyse est achevée en 8 heures. On recueille par filtration 17,89 d'acide cholalique.

Les jus débarrassés de l'excès de SO^4H^2 par la baryte sont concentrés au bain-marie sur légère acidité sulfurique.

Après cristallisation de la plus grande partie des sels minéraux $\text{SO}^4\text{N}^2\text{a}$, NaCl , on isole la taurine qui est purifiée par plusieurs cristallisations.

Les cristaux recueillis pèsent 2,11.

2° 50 grammes de sels biliaires hydrolysés par 50 grammes de SO^4H^2 dans 1.000 centimètres cubes d'eau donnent, d'après la même technique, 4,15 de taurine.

Dans aucune de ces deux opérations avec la bile de chien il n'a été possible de déceler de glyocolle.

Congre (conger vulgaris, Cuv.). — 1° On dissout 25 grammes de sels biliaires dans 100 centimètres cubes d'eau.

On chauffe à 130° au bain d'huile et pendant l'ébullition on ajoute 50 grammes SO^4H^2 étendu.

Au bout de 7 heures de chauffe, l'hydrolyse est terminée ; par refroidissement l'acide cholalique se prend en une masse brune qui séchée pèse 11 gr. 80.

Les eaux acides sont neutralisées par $\text{Ba}(\text{OH})^2$ qui précipite SO^4H^2 à l'état de SO^4Ba . Pendant cette opération on perçoit une forte odeur acide piquante qui irrite les lèvres.

On concentre à cristallisation.

Les sels éliminés on obtient de beaux cristaux caractéristiques de taurine ; $\text{P} = 0,91$.

2° 12 grammes de sels biliaires hydrolysés dans une liqueur plus riche en SO^4H^2 (10 o/o) donnent à peu près le même rendement : 0,78 de taurine cristallisée.

De ces expériences faites avec le mélange des sels biliaires, préparés d'après notre technique, il résulte qu'avec la bile de bovidé adulte seulement nous avons pu obtenir du glyco-colle, dans la proportion de 30 o/o par rapport à la taurine.

Cette dernière, au contraire, a été trouvée dans toutes les biles.

Si donc on conclut de l'acide amidé au sel biliaire correspondant, d'après la conception classique, on peut dire que parmi les biles riches en sels biliaires soufrés, celle de bovidé seule, mais de bovidé adulte, paraît contenir du glycocholate.

Tels sont les résultats obtenus dans ces conditions : ce sont des résultats qui ne cadrent pas exactement avec les données classiques ; ils conservent cependant toute leur valeur à cause de leur caractère purement expérimental.

VIII. Recherches personnelles sur la séparation des sels biliaires. — Nous avons mis à l'épreuve les diverses méthodes classiques en opérant d'abord sur le mélange artificiel des sels biliaires préparés à l'état cristallisé, puis sur chacun des sels pris séparément.

Nous avons constaté dans le cas du mélange qu'il se produit, sous l'influence des réactifs classiques, sels de plomb, de fer, d'alumine, des entraînements importants d'un sel par l'autre, et que dans le deuxième cas, la précipitation peut être totale avec l'un quelconque de ces sels minéraux.

La spécificité de ces réactifs est donc loin d'être suffisante.

Devant le peu de sécurité de ces techniques nous avons essayé, à notre tour, une série de réactifs vis-à-vis de chacun des sels biliaires (glycocholate de soude cristallisé de la bile de porc et taurocholate cristallisé de la bile de chien) en solution alcoolique ou aqueuse.

1. *Solutions alcooliques.* — Réactifs et sels biliaires dissous dans l'alcool méthylique ou éthylique.

Acétate neutre de plomb : dans les solutions de glycocholate, précipité abondant grumeleux soluble dans un excès d'alcool.

En liqueur taurocholique mêmes réactions.

Acétate basique de plomb : défèque très abondamment le taurocholate — agit peu sur le glycocholate — ici également phénomène accessoire de solubilité dans l'alcool.

ZnCl^2 , F^2Cl^6 , Sb^3Cl^6 : précipitation des deux sels.

SnCl^2 : dans les solutions de glycocholate donne un précipité blanc jaunâtre, floconneux à froid, grenu et blanchâtre à chaud.

Le taurocholate n'est pas précipité immédiatement ; au bout d'un certain temps faible dépôt.

Malheureusement sur le mélange des deux sels biliaires, défécation totale.

SnCl^4 , AsCl^3 , aucune modification apparente.

En résumé les combinaisons obtenues avec ces réactifs ont conservé, à un degré plus ou moins élevé, la solubilité des acides biliaires dans l'alcool et ne peuvent servir par suite de moyens de séparation de ces acides.

2. *Solutions aqueuses.* — En solutions aqueuses sels biliaires et substances minérales réagissent d'une façon tout autre qu'en milieu anhydre.

L'acétate neutre de plomb précipite incomplètement les solutions de taurocholate, totalement celles de glycocholates.

L'acétate basique défèque les deux sels séparés ou à l'état de mélange artificiel.

On comprend dès lors combien est délicate la séparation de sels biliaires par les sels de plomb, et pourquoi elle ait donné à STRECKER des résultats insuffisants.

Les sels de fer, en particulier le chlorure ferrique (Fe^3Cl^6) précipite à froid, le glycocholate de soude ; par chauffage le précipité devient grenu, rouge brique ; en même temps une partie se dissout en donnant une liqueur rappelant la coloration des sels basiques.

Le taurocholate donne des grumeaux insolubles à chaud.

Les sels de zinc, de cuivre, d'urane font avec les sels biliaires des précipités gélatineux.

Les sels neutres, alcalins et alcalino-terreux, les bases alcalines et terreuses ont une action plus intéressante.

PELÜGER, TENGSTRÖM, HAMMARSTEN ont déjà étudié l'influence des sels alcalins neutres, en particulier, des chlorures de potassium et de sodium (nous les rappellerons à propos de la préparation des taurocholates).

Nos recherches ont surtout porté sur le rôle des alcalis et des alcalino-terreux.

Dans les solutions aqueuses étendues de glycocholates de soude cristallisée l'addition par petites quantités de soude ou de potasse provoque, lorsque la concentration en base est suffisante, un *précipité cristallin de sel biliaire*. C'est sur cette observation que nous avons basé la préparation de l'acide glycocholique.

Si on dépasse cette teneur favorable, il se produit de petites gouttes huileuses, blondes, qui montent à la surface et se réunissent en une nappe uniforme. Ce phénomène est de tous points analogue au relargage des savons sous l'influence des lessives de recuite.

Les alcalis, à faible concentration, ne modifient pas les solutions de taurocholates. Il faut employer des lessives lourdes pour observer quelque chose. On constate alors que la solution biliaire perd sa transparence, puis devient laiteuse. Assez rapidement elle s'éclaircit de nouveau ; il s'est formé de nombreuses gouttelettes huileuses qui montent à la surface. Si alors on soumet cette liqueur à l'action du froid, elle se prend en une masse pâteuse semi-solide. L'examen microscopique montre la présence de fines aiguilles cristallines, non flexueuses, polarisant fortement la lumière. De même que le glycocholate, le *taurocholate de soude a donc cristallisé*.

Ces deux faits très importants nous permettent dès maintenant de tirer les conclusions suivantes sur le rôle principal

des sels biliaires en biologie et leur place dans la nomenclature physiologique.

Les sels biliaires sont relargués par des concentrations déterminées en alcalis caustiques, ce sont bien de vrais savons, des savons organiques.

Ces savons biliaires peuvent être obtenus à l'état cristallisé dans certaines conditions de température et de teneur en bases. Le glycocholate cristallise dans des lessives faibles, le taurocholate exige des lessives lourdes.

Il y a donc dans la bile au point de vue solubilité deux savons principaux, l'un peu soluble (glycocholate), l'autre très soluble (taurocholate).

Les sels neutres des métaux alcalino-terreux, chlorures, nitrates, sulfates, précipitent l'acide glycocholique, sous forme de flocons blancs de glycocholates de baryum, de strontium et de calcium. Au contraire les solutions de taurocholates ne donnent aucune précipitation.

La baryte et la chaux se comportent exactement de la même façon vis-à-vis des sels biliaires.

Ces réactions sont extrêmement nettes. Etant donné un mélange des deux solutions biliaires, l'addition de base précipite l'acide glycocholique, en laissant à l'état dissous l'acide taurocholique.

On filtre le glycocholate de baryum insoluble, on carbonate la partie liquide, et on évapore à sec pour isoler l'acide soufré.

Nous avons cru pouvoir appliquer cette technique au traitement général de la bile des diverses espèces.

Mais jusqu'ici nous n'avons obtenu de bons résultats qu'avec les biles dans lesquelles l'un des deux sels biliaires prédomine ; les biles de chien et de porc, la première presque uniquement composée de taurocholates, la seconde de glycocholate.

La bile des autres espèces animales se prête mal à ce même traitement soit qu'il reste à fixer les limites de concentration des liqueurs, qu'il y ait des différences moléculaires impor-

tantes entre les acides glycocholiques ou même qu'il existe des sels doubles, des tauro-glycocholates alcalins donnant par hydrolyse la même racine cholalique et les deux chaînes azotées, taurine et glyocolle.

Nous nous proposons de poursuivre nos recherches dans cette voie.

Nous citerons comme application de notre méthode de traitement de la bile quelques expériences sur la bile du porc, chien, veau, bœuf et congre en n'insistant que sur les points principaux.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

Bile de porc. — 1^o On part d'un litre de bile qu'on laisse reposer 24 heures au frais. Après dépôt des matières solides en suspension on décante la partie claire.

500 centimètres cubes de ce liquide sont additionnés de 250 centimètres cubes d'eau distillée pour diminuer la viscosité, puis introduits dans une boule à robinet de 1 litre 1/2. On fait un premier épuisement avec 200 centimètres cubes d'éther; en agitant avec précaution au début on diminue la tendance à l'émulsion. L'éther monte peu à peu au-dessus de la solution biliaire et forme une belle nappe d'un jaune d'or. On la sépare et la remplace par un volume égal, et cela cinq à six fois. Au dernier traitement le solvant n'enlève que des traces de matière.

L'addition d'éther de pétrole à l'éther dans la proportion de 25 o/o permet d'éviter ou de rompre l'émulsion.

Les éthers d'extraction sont réunis pour être distillés. On obtient un extrait pesant 17 gr. 2, de coloration jaune avec des striés orangées de bilirubine. Une petite quantité de ce pigment resté adhérent aux parois du ballon ayant servi à la distillation est reprise par le chloroforme.

L'extrait est traité en vue de la séparation des graisses, acides gras, cholestérines.

La bile épuisée est versée dans un large plat en porcelaine et évaporée aussi complètement que possible au bain-marie. L'opération demande environ trois jours, on aboutit à un sirop très épais contenant encore 10 o/o d'eau. Un séjour de 60 heures à l'étuve à 40° achève le départ de cette eau.

L'extrait sec recueilli avec soin pèse 73,5. Sa coloration est jaune brunâtre; il est ici peu hygroscopique.

On le réduit en petits fragments puis on l'introduit dans un ballon contenant un litre d'alcool méthylique fort. On chauffe au réfrigérant ascendant. Après deux heures d'ébullition toute la masse est dissoute; il ne reste que des flocons jaune brunâtre qui nagent dans le liquide et un faible dépôt de substances minérales. La liqueur est filtrée et le précipité total recueilli lavé sur filtre.

On obtient ainsi les mucines et une partie des substances minérales de la bile. $P = 4$ gr. 5.

La solution alcoolique formant un volume de 1.250 centimètres cubes est alors traitée à l'ébullition par le métholate de baryum. On ajoute par très petits volumes 125 centimètres cubes de réactif pour précipiter toutes les substances pigmentaires. La liqueur est devenue blonde, et sa réaction nettement alcaline. Le précipité de défécation barytique est filtré, lavé jusqu'à neutralité puis séché, il pèse 3 gr. 2.

On distille l'alcool méthylique. Le résidu sirupeux, d'odeur fade, de coloration blonde, est repris par 300 centimètres cubes d'eau distillée. La solution est trouble, à sa surface se réunissent bientôt des matières grasses qui ont échappé à l'épuisement étheré de la bile et dont le poids est de 2 gr. 3.

La solution aqueuse des sels biliaires est carbonatée à chaud, filtrée et ramenée au volume initial de la bile, c'est-à-dire à 500 centimètres cubes.

Sur 25 centimètres cubes de cette liqueur nous avons constaté un fait intéressant. Après concentration au bain-marie jusqu'à un volume de 7 à 8 centimètres cubes, il s'est formé par refroidissement un fin dépôt brillant et soyeux, formé au microscope de longues aiguilles soyeuses, rigides ou flexueuses, polarisant la lumière. C'était, comme nous le verrons plus tard, une cristallisation de glycocholate de soude sous l'influence d'une simple concentration.

Le reste de la liqueur est additionné à froid d'eau de baryte saturée jusqu'à cessation de précipité. Il se fait une abondante défécation sous forme de gros flocons blanchâtres que l'on filtre et lave rapidement.

Les eaux sont carbonatées à chaud, filtrées et concentrées à sec au bain-marie et à l'étuve. On isole un faible résidu, de couleur blonde, de saveur amère et sucrée, riche en soufre ; c'est le taurocholate de soude.

20 On prend 250 centimètres cubes de bile claire après décantation.

On l'épuise sans addition d'eau par un mélange de 650 centimètres cubes d'éther et 250 centimètres cubes d'éther de pétrole. Le poids de l'extrait étheré est de 4 gr. 2.

Dans cette expérience nous avons remarqué l'existence d'une proportion de bilirubine beaucoup plus importante que dans la précédente.

L'isolement a été obtenu en reprenant l'extrait par un petit volume d'éther ; les matières grasses sont dissoutes, le pigment orangé est repris par le mélange chloroforme-tétrachlorure de carbone et abandonné à la cristallisation par évaporation lente à l'abri de la lumière.

La bile, moins l'extrait étheré contenant les graisses, acides gras, cholestérines, est concentrée au bain-marie jusqu'à sirop très épais, puis séchée complètement à l'étuve à 40°.

Le résidu sec pèse 38 grammes.

On le dissout dans 600 centimètres cubes d'alcool méthylique. La partie insoluble est formée des mucines et des sels, son poids s'élève à 2 gr. 1.

La solution alcoolique est traitée par le métholate de baryte ; 74 centimètres cubes de réactif sont nécessaires. Le précipité pigmentaire barytique après filtration et lavage pèse 1 gr. 50.

On distille à sec l'alcool méthylique et on reprend par 150 centimètres cubes d'eau.

Les matières grasses sont enlevées par un épuisement à l'éther.

La solution des sels biliaires, après précipitation du baryum à l'état de carbonate, est évaporée à sec. $P = 30$ gr. 4. Par la baryte aqueuse on sépare de petites quantités d'acide amer.

Moyennes des expériences rapportées à 1.000 centimètres cubes de bile de porc :

Extrait éthéré total $\left\{ \begin{array}{l} \text{Bilirubine} = \text{traces.} \\ \text{Matières grasses} = 19,3. \end{array} \right.$

Extrait sec = 155.

Mucines et sels = 9,3.

Précipité barytique de défécation pigmentaire = 7.

Sels biliaires = 120.

Bile de chien. — 1° On traite 500 centimètres cubes de bile fraîche de chien conservée quelques jours seulement en présence de chloroforme.

Après addition de 250 centimètres cubes d'eau distillée on verse dans une boule à robinet et on ajoute de l'éther; 900 centimètres cubes de solvant sont employés en six fois pour obtenir un épuisement total. A chaque renouvellement de l'éther la coloration jaune fortement orangée du début s'atténue progressivement.

Les éthers d'extraction sont réunis puis distillés, ils abandonnent 8 gr. 50 d'extrait très riche en bilirubine. La séparation de celle-ci se fait comme nous l'avons déjà dit.

Les matières grasses sont formées de cholestérines, de graisses, de savons, d'acides gras cristallisables ou non et de lécithines.

La bile dégraissée est soumise à la dessiccation. On obtient le résidu sec avec beaucoup de peine; il faut plusieurs jours de chauffe au bain-marie et à l'étuve. On recueille rapidement et on pèse; $P = 120$ grammes. Il est très hygroscopique.

On le traite dans un ballon de 1 litre $1/2$ par 800 centimètres cubes d'alcool méthylique. La presque totalité se dissout, il ne reste que des flocons brunâtres qui se déposent par repos. On filtre le précipité qui est lavé puis séché; sa coloration passe progressivement du jaune-brun au brun foncé.

Le poids des mucines et des sels est de 3 gr. 2.

Nous avons vu plus haut qu'une certaine proportion (10 à 15 o/o) de ces substances azotées peuvent être redissoutes dans l'eau.

La solution alcoolique de bile est alors additionnée à l'ébullition de métholate de baryte. On utilise 115 centimètres cubes de réactif. Le précipité obtenu, lavé et séché pèse 5,3. Il contient à l'état de sel de baryum tous les pigments orangés et verts. La bilirubine en particulier est ici abondante; elle peut être libérée de sa combinaison terreuse.

Après distillation de l'alcool méthylique et concentration à sec on reprend par 350 centimètres cubes d'eau distillée; on carbonate et on isole encore une quantité appréciable de matières grasses = 2,35.

La liqueur aqueuse ramenée à 500 centimètres cubes est traitée par l'eau de baryte saturée. On obtient un faible précipité.

Le poids total des sels biliaires = 97 gr. 5.

2° 250 centimètres cubes de bile non diluée sont épuisés par un mélange à parties égales d'éther sulfurique et d'éther de pétrole. Cinq extractions sont faites avec un volume total de 580 centimètres cubes de solvant.

L'extrait obtenu pèse 2,65; il contient avec les matières grasses de la bilirubine libre.

On évapore la bile à sec; le poids du résidu est de 61 grammes.

Il est dissous dans 450 centimètres cubes d'alcool méthylique et donne un insoluble (mucus et substances minérales) pesant sec 1 gr. 5.

A chaud l'addition de 60 centimètres cubes de métholate de baryum défèque les pigments. Le précipité séparé est de 3 grammes.

L'alcool est distillée et le résidu repris par l'eau, carbonaté et épuisé par l'éther, est traité par la baryte aqueuse.

Le poids des sels biliaires s'élève à 50 grammes.

Moyennes des expériences rapportées à 1.000 centimètres cubes de bile de chien :

Extrait éthéré total	{ Bilirubine = traces. Matières grasses totales = 12,3.

Extrait sec = 240.

Mucines et sels = 6,3.

Précipité barytique de défécation pigmentaire = 11.

Sels biliaires = 197.

Bile de congre. — 1° La bile de ce poisson se compose, comme nous l'avons déjà dit, de deux parties, une liquide jaunâtre et une solide formée par des masses visqueuses vertes ou vert bleuâtre.

On part de 500 centimètres cubes de bile entière contenant neuf masses solides, les unes de la grosseur d'une noix, les autres d'un œuf de poule.

De même que pour la bœuf on ne peut épuiser directement ce mélange hétérogène par l'éther.

On la dessèche donc au bain-marie et on reprend par 800 centimètres cubes d'alcool fort.

Les mucines et les sels minéraux restent insolubles. Poids = 3,9.

L'alcool est distillé; le résidu, repris par 300 centimètres cubes d'eau, est épuisé par 800 centimètres cubes d'éther.

L'extrait éthéré pèse 3,6; abandonné à une lente évaporation il reste huileux, sans aucune tendance à la cristallisation, comme cela a lieu pour les autres biles. Nous n'avons pu en isoler de cholestérine,

On est ramené dès lors au traitement général.

La bile est concentrée à sec; le résidu pèse 84 grammes.

On le dissous dans 750 centimètres cubes d'alcool méthylique et on le traite à l'ébullition par 110 centimètres cubes de métholate de baryte.

Le précipité pigmentaire est peu important; P = 3,5. Il ne paraît pas contenir de bilirubine; en effet, traité par l'acide chlorhydrique étendu,

lavé, séché, il ne cède rien au chloroforme, au tétrachlorure de carbone ou au chlorure de benzyl. Au contraire il est assez riche en pigments verts ou vert bleuâtres.

L'alcool est distillé et le résidu repris par 500 centimètres cubes d'eau distillée, épuisé à l'éther qui enlève une petite quantité d'huiles, puis carbonaté, précipite faiblement sous l'influence de l'eau de baryte.

Le poids des sels biliaires secs est de 63 grammes.

20 250 centimètres cubes de bile renfermant six masses muqueuses sont desséchés au bain-marie puis repris par 500 centimètres cubes d'alcool.

Le poids de la matière insoluble est de 2 grammes.

L'alcool est distillé, le résidu dissous dans l'eau distillée est épuisé avec 500 centimètres cubes d'éther.

L'extrait étheré pèse 18 grammes.

Le résidu sec de la bile évaporée complètement est de 31 grammes.

Repris par 450 centimètres cubes d'alcool méthylique et traité par 48 centimètres cubes de métholate de baryte, ce résidu donne un précipité pigmentaire barytique de 2 gr. 2.

Le poids des sels biliaires est de 32 grammes.

Moyennes des expériences rapportées à 1,000 centimètres cubes de bile de congre :

Extrait étheré total = 7,5.

Extrait sec = 150.

Mucines et sels = 7,2.

Précipité pigmentaire de défécation barytique = 8,5.

Sels biliaires = 128.

Bile de veau. — 1^o La bile de veau s'épuise sans difficulté avec l'éther seul ou additionné d'éther de pétrole.

On traite 500 centimètres cubes de bile de coloration verte en plusieurs fois par 850 centimètres cubes d'éther.

Le solvant se colore à peine, même dans les premiers contacts.

L'extrait est relativement faible; $P = 4,3$.

La bile après dessiccation complète donne un résidu pesant 106 grammes. C'est une matière brun verdâtre, aussi hygroscopique que celle de chien, d'odeur fade.

Réduite en fragments elle est traitée à chaud par 750 centimètres cubes d'alcool méthylique, au réfrigérant à reflux. De légers flocons brun verdâtres restent insolubles et se séparent par repos. On décante et on filtre.

Le filtrat (mucines et sels) pèse 5 grammes.

La solution alcoolique est additionnée de métholate de baryte; la précipitation totale exige 95 centimètres cubes de réactif.

On recueille le précipité dont le poids sec est de 5 gr. 4. La recherche de la bilirubine permet avec peine de déceler la présence de traces de ce pigment.

Après distillation de l'alcool on dissout le résidu dans 500 centimètres cubes d'eau distillée, on carbonate, on épuise à l'éther, puis on ajoute de la baryte aqueuse tant qu'il y a précipitation, ici très peu importante.

Les sels biliaires évaporés à sec forment une masse blonde, sucrée et amère; P = 45 grammes.

2^o 250 centimètres cubes de bile orangée de veau sont épuisés par un mélange de 550 centimètres cubes d'éther et de 350 centimètres cubes d'éther de pétrole.

Les liqueurs d'extraction sont légèrement colorées en jaune safran. Poids de l'extrait = 2 grammes.

Présence de traces très nettes de bilirubine.

La bile concentrée à sec donne un résidu du poids de 55 grammes, de coloration jaune brunâtre.

On le dissout dans 450 centimètres cubes d'alcool méthylique et à l'ébullition on lui ajoute 50 centimètres cubes de métholate de baryte.

Le précipité pigmentaire alcalino-terreux est peu abondant = 1 gr. 2; il contient des traces de bilirubine.

Le poids des sels biliaires s'élève à 22 grammes.

Moyennes des expériences rapportées à 1.000 centimètres cubes de bile de veau :

Extrait éthéré total { Bilirubine = traces très faibles.
 { Matières grasses totales = 5,4.

Extrait sec = 101.

Mucines et sels minéraux = 4,66.

Précipité pigmentaire de défécation barytique = 5,3.

Sels biliaires = 91.

Bile de bovidé adulte. — 1^o On part de 500 centimètres cubes de bile verte, extrêmement visqueuse.

On évapore au bain-marie à consistance sirupeuse; la dessiccation est achevée à l'étuve à 40°.

Le résidu est repris par 700 centimètres cubes d'alcool méthylique qui laisse 5 gr. 6 d'insoluble constitué par des sels et surtout des mucines.

Après distillation de l'alcool on dissout dans 500 centimètres cubes d'eau, et on est ainsi ramené au volume primitif de bile que l'on épuise par 600 centimètres cubes d'éther et 200 centimètres cubes d'éther de pétrole.

L'extrait éthéré pèse 2 gr. 8.

On évapore à nouveau à sec; P = 48 gr. 5.

La défécation du résidu sec par le méthanol barytique faite à chaud dans la solution méthylique donne un précipité pigmentaire et barytique; P = 3,1.

La recherche des pigments dans ce précipité montre qu'il s'agit surtout de matières vertes; bilirubine seulement à l'état de traces.

L'ensemble des sels biliaires débarrassés des très petites quantités de substances grasses résiduelles pèse 45.

2^o 250 centimètres cubes de bile orangée.

Après dessiccation complète le résidu est repris par l'alcool qui abandonne 2,3 d'insoluble. On épuise la solution aqueuse par 500 centimètres cubes d'éther.

Extrait éthéré; P = 1,6.

Extrait sec = 23,2.

Précipité pigmentaire à l'aide du méthanol barytique P = 1,7, contenant une proportion plus grande de pigments orangés.

Poids des sels biliaires = 22.

Moyennes des expériences rapportées à 1.000 centimètres cubes de bile de bœuf :

Extrait éthéré total : matières grasses = 6.

Extrait sec = 107.

Mucines et sels minéraux = 11,3.

Précipité de défécation barytique = 6,2.

Sels biliaires = 92.

CHAPITRE III

PYROGÉNATION DE LA BILE

Bien que cette méthode ne soit plus en faveur nous avons tenté de l'appliquer à la bile. On sait, en effet, que si les corps riches en azote et en oxygène subissent, pendant la pyrogénéation, des décompositions profondes, il n'en est pas de même pour les substances à chaînes longues. Les carbures gras distillent volontiers, et leur connaissance peut fournir de précieux renseignements sur la constitution des molécules auxquelles ils appartiennent.

En présence d'alcalins et d'alcalino-terreux la pyrogénéation permet aussi la synthèse de cétones dont l'isolement apporte également des indications importantes.

Nos recherches ont porté sur les biles de bœuf et de porc.

La bile est recueillie dans des récipients de forme haute rendant plus aisé le dépôt des matières solides en suspension ainsi que la décantation du liquide clair surnageant.

On prend un certain volume de celui-ci qu'on verse dans une capsule plate en porcelaine. Après concentration au bain-marie jusqu'à sirop épais, on ajoute son volume de soude ou de potasse ; à chaud il se fait un savon homogène très épais.

Le mélange bile-alcali est transvasé dans une marmite en fonte et chauffé à petit feu en agitant constamment. Il se dégage de l'ammoniac pendant un certain temps. On cesse de chauffer lorsque la concentration est achevée. On a alors une matière de consistance butyreuse, verdâtre avec la bile de bœuf, jaunâtre avec celle de porc, répandant une odeur de carbures octyliques.

A cet état elle est prête à la pyrogénéation.

La distillation sèche est pratiquée à l'aide d'une bouteille à mercure, suivant un dispositif qu'il ne nous a pas paru intéressant de décrire.

On chauffe d'abord lentement pour achever de chasser l'eau et fondre la masse. Sans cette précaution il se produit rapidement un boursofflement de la matière et par suite une obturation de l'orifice de dégagement des vapeurs.

Il s'échappe d'abord de la vapeur d'eau qui se condense dans le ballon récepteur.

Vers 80° passent des vapeurs qui, par refroidissement, donnent un liquide citrin, huileux, très réfringent.

Entre 120° et 160° la distillation devient plus abondante, on recueille un liquide à peine coloré.

De 160° à 220° il y a ralentissement notable. Le liquide distillé possède une teinte brune très nette.

A partir de 240° jusqu'à 300° nouveau maximum dans le rendement. On obtient une huile très foncée qui se condense vite et s'écoule lentement.

Enfin de 300° à 400°, ce sont des goudrons brun rougeâtre qui se prennent en une poix épaisse très près de la bouteille ; on ne peut les faire arriver au ballon récepteur qu'en chauffant le tube de dégagement dans toute sa longueur.

On arrête la pyrogénéation à ce moment.

Dans la bouteille il ne reste qu'un produit noirâtre, très salin, à demi-calciné.

A chaque expérience on traite 600 gr. de savon biliaire.

Les produits de la distillation sont isolés pour être traités ; ils forment cinq portions :

1 ^{re} portion,	produits qui passent de 80 à 120°
2 ^e	— — — 120 à 160
3 ^e	— — — 160 à 220
4 ^e	— — — 240 à 300
5 ^e	— — — 300 à 400

Telle est la marche générale des expériences.

Nous avons fait varier quelques-unes des conditions, en particulier la proportion d'alcali ajoutée à la bile.

La pyrogénéation faite sans addition de base caustique donne de mauvais résultats.

On constate que la calcination commence dès que la bile a dépassé l'état sirupeux ; il ne se produit alors qu'une distillation extrêmement faible.

Il nous a semblé que la principale raison était due à la présence de matières azotées, mucines ou pseudo-mucines qui charbonnent très vite.

En effet, si on débarrasse, au préalable, la bile de ces substances, soit par précipitation à l'aide d'alcool selon le procédé d'HÜFNER, soit d'après notre technique par évaporation à sec suivie de reprise par l'alcool, on remarque que la distillation quoique médiocre est cependant plus abondante.

Le rôle des alcalis est triple. Ils protègent les matières organiques contre l'action brutale du feu nu en formant une masse homogène qui bout à une température élevée.

En outre la présence d'eau retenue énergiquement par NaOH ou KOH permet et facilite l'entraînement des produits de pyrogénéation.

Enfin, comme pour les alcalino-terreux dans la formation artificielle de cétones grasses, les alcalis se prêtent à la libération des chaînes carburées par destruction des carboxyles terminaux.

La quantité de soude ou de potasse qui donne le maximum de rendement est d'environ 10 pour 100 gr. de bile sèche.

Au-dessous de 5 o/o le rendement est inférieur.

Au-dessus de 18 o/o, la trop grande proportion des matières minérales gêne la distillation.

Le rendement en produits volatils s'élève de 14,2 à 17,6 pour 100 gr. de bile sèche dans le cas de bile de bovidé.

En reprenant chacune des cinq portions et en soumettant celles qui passent entre 80 et 120°

120 et 160

240 et 300

à une nouvelle distillation on isole :

1° Un liquide incolore qui passe de 90 à 110° ;

2° Un liquide légèrement coloré en brun de (120-140°) qui correspond à un maximum inférieur ;

3° Un liquide fortement brunâtre (de 260-280°) qui représente un maximum supérieur.

Combustions

Produit distillant entre (90-110°) :

Matière = 0,2075

Acide carbonique = 0,6355

Eau = 0,2215

soit en centièmes :

C = 84,2

H = 11,9

Produit correspondant au maximum inférieur (120-140°) :

Matière = 0,2592

Acide carbonique = 0,7220

Eau = 0,2485

soit en centièmes :

C = 75,95

H = 10,53

Produit correspondant au maximum supérieur (260-280°) :

Matière = 0,2818

Acide carbonique = 0,7513

Eau = 0,3007

soit en centièmes :

C = 72,70

H = 12,48

Dans les queues de pyrogénéation on sépare par la méthode classique de petites quantités de bases complexes et aussi de phénols qui, au moment de leur libération par l'acide chlorhydrique, donnent lieu à des réactions colorées très intenses variant du vert au bleu et au violet.

La pyrogénéation de la bile de porc en présence de baryte nous a donné en produits volatils un rendement beaucoup plus important que celle du bœuf, de 30,50 à 33,54 o/o de bile sèche.

Malgré le nombre des expériences faites et dont nous ne donnons qu'un très court résumé, nous avons abandonné cette question pour nous consacrer à l'étude des substances biliaires d'un intérêt beaucoup plus grand.

TROISIÈME PARTIE

ETUDE DES ACIDES BILIAIRES

CHAPITRE PREMIER

ACIDE GLYCOCHOLIQUE

I. Historique. — L'acide glycocholique a été isolé par **STRECKER** (1) qui, en même temps en a élucidé la constitution moléculaire, démontrant qu'il est composé d'un noyau à fonction acide (acide cholalique) et d'un acide amidé le glyco-cocolle.

Il partait de la bile de **PLATTNER** préparée d'après la technique classique modifiée par lui-même.

De la bile est évaporée au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse, puis à siccité complète par chauffage au bain d'huile à 120°. Le résidu est dissous dans de l'alcool absolu froid. Sans décolorer, on ajoute dans la liqueur alcoolique, une petite quantité d'éther. Il précipite une masse sirupeuse et très colorée ; quelque temps après on observe la formation de groupes de cristaux en étoiles mêlés à des matières amorphes.

La solution surnageante rouge claire est versée dans un

(1) **STRECKER**, *Liebig's Annal. Chem. Pharm.*, 65, 9.

vase très sêc et additionnée d'éther. Il se forme un louche plus ou moins épais suivant la quantité de solvant ajouté. Bientôt sur les parois viennent se former des étoiles cristallines blanches ou légèrement jaunâtres.

On décante l'alcool éthéré. On agite fortement les cristaux avec de l'alcool contenant 10 o/o d'éther dans lequel ils ne sont pas solubles. Les cristaux filtrés et lavés avec cette même liqueur sont pressés, puis séchés sur acide sulfurique.

STRECKER, pour obtenir l'acide glycocholique fait une solution aqueuse de ces cristaux, puis y verse de l'acide sulfurique dilué. La solution se trouble et après quelques heures il se sépare des aiguilles blanches qui donnent souvent au liquide une consistance semi-solide. Fréquemment entre les cristaux se trouvent des gouttelettes huileuses. Les cristaux recueillis sur filtre sont lavés à l'eau froide qui dissout les matières amorphes. Repris par l'eau chaude ils donnent des écailles nacrées peu nombreuses. Par refroidissement se dépose l'acide *cholique* de STRECKER appelé aujourd'hui acide glycocholique.

Le résidu resté sur filtre est, d'après STRECKER, une modification insoluble dans l'eau de l'acide cholique (acide glycocholique), modification qui, dissoute dans l'alcool et reprécipitée par l'eau, se transforme en acide glycocholique ordinaire.

STRECKER l'appelle acide *paracholique*.

Le savant chimiste déclare qu'on pourrait aussi préparer l'acide glycocholique en partant de la bile elle-même après purification de celle-ci, mais nulle part il n'indique de technique particulière.

Plus tard HÜFNER (1) fait connaître une méthode à partir de la bile du bœuf traitée directement : « On verse un certain volume de bile dans un tube à essai, puis de l'éther par dessus et enfin un acide minéral. Le trouble laiteux du début devient bientôt cristallin et parfois si vite qu'en quelques minutes le

(1) HÜFNER, *Journal für prak. Chem.* [2] 10, 267 und 19, 302.

liquide qui se trouve sur l'éther se prend en masse. Si on délaie cette dernière avec de l'eau froide jusqu'à la consistance d'une bouillie claire et qu'on filtre, la masse cristalline qui reste sur filtre est pure. Il suffit de la reprendre par de l'eau chaude pour obtenir l'acide glycocholique cristallisé ».

LASSAR-COHN (1) qui résume cette technique ajoute : « ces expériences ont été faites à Tubingen. Il est curieux de constater que dans d'autres pays (Leipzig, Berlin, Kœnisberg) les biles ne se comportent pas ainsi, tandis qu'à Tubingen il n'y en a que 20 o/o qui ne donnent pas la réaction ».

A son tour EMICH (2) propose une méthode devant toujours permettre, selon lui, d'obtenir l'acide glycocholique contenu dans une bile : « On dessèche la bile au bain-marie, on pulvérise puis on traite par l'alcool. Après distillation de celui-ci on dissout le sirop résiduel dans dix ou quinze parties d'eau. On agite cette solution avec de l'éther ou du benzol, puis on ajoute pour un litre de bile 40 cc. d'acide chlorhydrique concentré ; le mélange est laissé au repos jusqu'à cristallisation. Les cristaux sont séparés par filtration et lavés à l'eau froide. On isole l'acide biliaire en faisant cristalliser dans l'eau chaude mais non bouillante ».

Enfin tout récemment HAMMARSTEN (3) a donné un nouveau procédé calqué sur celui de STRECKER.

On additionne la bile de son volume d'alcool fort, on filtre et distille l'alcool. Le résidu aqueux est précipité par une solution de sous-acétate de plomb. Ce précipité est décomposé à chaud par une solution de carbonate de soude. On évapore à siccité sur le bain-marie et l'on épuise par l'alcool fort. Après filtration et distillation de l'alcool, le résidu est dissous dans l'eau puis traité par le noir animal. A la solution filtrée on ajoute de l'éther en excès et l'on précipite l'acide

(1) LASSAR-COHN, *Die Sauren der Rindergalle und Menschengalle*, 1898. Leipzig.

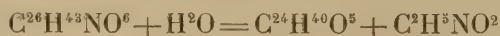
(2) EMICH, *Monash. f. chem.*, 3, 335.

(3) HAMMARSTEN (*Lehrbuch der physiolog. Chem.*, 1907).

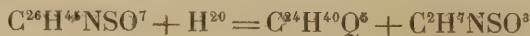
glycocholique par addition d'acide chlorhydrique dilué. Les cristaux d'acide glycocholique et *glycocholénique* sont essorés à la trompe puis traités par de l'eau bouillante qui dissout l'acide glycocholique seul. On filtre à chaud et on laisse le filtratum refroidir et cristalliser. L'acide glycocholénique reste sur filtre. Les cristaux d'acide glycocholique sont dissous dans une solution étendue chaude de carbonate de soude; on neutralise avec HCl étendu et on évapore au bain-marie. On sépare le glycocholate de soude des restes de sel marin en le traitant par l'alcool ».

Telles sont les différentes et nombreuses techniques qui tour à tour ont été proposées pour préparer l'acide glycocholique de la bile.

Sans nier que l'on ait obtenu l'acide glycocholique cristallisé à l'état de pureté, nous tenons cependant à répéter que STRECKER, dont le travail sur cette question est certainement le plus rigoureux, s'est beaucoup appuyé sur les produits du dédoublement hydrolytique de ce composé pour établir sa constitution et en fixer l'équation



De même pour l'acide taurocholique; l'hydrolyse du précipité obtenu par l'acétate basique de plomb sur la solution aqueuse de la bile cristallisée de PLATTNER, l'a conduit, sans avoir isolé cet acide à l'état pur, à établir sa formule et l'équation de sa décomposition :



Dans les deux cas, en effet, il obtenait avec un même noyau cholalique deux acides amidés différents, le glycocolle et la taurine,

Pour STRECKER les méthodes d'hydrolyse ont toujours eu une importance primordiale relativement à la connaissance des acides biliaires. Au contraire les caractères de précipitation par les sels de plomb en particulier passaient au second plan puisque d'ailleurs les précipités étaient impurs.

Après STRECKER il semble bien que l'identification chimique par l'analyse hydrolytique ait été totalement abandonnée parce que trop longue et trop délicate. La plupart des auteurs se sont seulement occupés des caractères de solubilité, de combinaison avec les sels minéraux, les bases, les acides, etc. Leurs techniques ont pour but d'isoler directement dans le milieu biliaire si complexe, une ou plusieurs substances possédant ces propriétés secondaires.

On comprend dès lors dans quelle voie peu sûre on s'engage sans autres points de repère certains. Nous croyons qu'il ne suffit pas, même en chimie physiologique, de préparer, d'isoler des substances de pureté douteuse et moins encore de se contenter d'impureté connue. Le seul but scientifique à atteindre est la pureté aussi parfaite que possible.

II. Glycocholate de soude dans la bile du porc. — Nous venons de voir, d'après les auteurs eux-mêmes, quels sont les inconvénients des diverses méthodes de préparation de cet acide biliaire : faible rendement, pureté relative.

D'autre part, nous avons vu au laboratoire appliquer rigoureusement ces diverses techniques sans obtenir des résultats même médiocres.

Il nous a paru qu'il était beaucoup plus logique comme cela est une règle dans l'industrie, pour obtenir une substance donnée, de s'adresser à une matière qui la contient déjà au maximum de pureté ou de quantité.

Nous avons choisi comme source de matière première, la bile de porc, pour préparer l'acide glycocholique.

La bile de cet animal, STRECKER l'avait déjà établi, est très riche en glycocholate alcalin.

Au contraire la bile des autres espèces contient, d'après les auteurs, des proportions de ce sel très variables non seulement dans chaque espèce mais même suivant les races et les individus. HÜFNER ne put obtenir d'acide glycocholique sur 20 o/o des bœufs sacrifiés aux abattoirs de Tubingen ; à Leipzig, Berlin, Königsberg, l'insuccès fut total. De même pour l'acide tauro-

chologique, LASSAR-COHN reconnut que la bile des bœufs allemands était beaucoup plus pauvre que celle des bœufs de la région de Saint-Petersbourg.

Il est donc délicat de s'adresser à des biles peu riches en glycocholate. Il y a en outre deux graves écueils qui guettent le chercheur ; le peu de spécificité des réactifs employés et surtout la grande facilité d'entraînement des deux acides biliaires l'un par l'autre.

La bile de porc est retirée des vésicules biliaires provenant des abattoirs, le jour même de leur récolte.

Nous laisserons de côté les caractères physiques de cette bile ; nous insisterons seulement sur quelques points particuliers qui nous ont paru intéressants et qui n'ont pas été signalés.

Dans nos recherches, le volume moyen de bile contenue dans chaque vésicule est notablement inférieur à la normale ; c'est qu'en effet pendant la récolte et pendant le transport il se produit toujours des pertes plus ou moins importantes. L'obturation du canal cholédoque obtenue, à l'abattoir, par simple torsion est insuffisante.

Nous avons obtenu les chiffres suivants :

Nombre de vésicules	Volume total de bile	Volume par vésicule
100	5.400 centimètres cubes	54
200	10.600 —	53
50	2.580 —	51

Volume moyen par vésicule = 52 centimètres cubes.

Au point de vue coloration nous avons dit que la bile est le plus souvent colorée en jaune orangé qui peut aller du jaune clair à l'orangé foncé. Dans certains cas on observe une teinte brunâtre parfois avec une faible nuance de vert. Ces différences se traduisent du reste par des modifications de spectre (p. 15).

Le contenu de la vésicule biliaire est le plus souvent liquide ; qu'il soit clair, limpide, ou rendu plus ou moins trouble par

la présence de flocons muqueux, de débris cellulaires ou de substances biliaires maintenues en suspension (1).

(1) On rencontre assez fréquemment de 5 à 70/o des cas, des vésicules, le plus souvent peu volumineuses, à demi-pleines, dont le contenu n'est plus qu'une boue épaisse, soyeuse, miroitante, qui s'écoule lentement. La coloration de ce contenu, au lieu d'être jaunâtre, est gris blanchâtre; aussi est-il facile de reconnaître ces vésicules à leur teinte que la transparence des parois cystiques permet d'apprécier.

Enfin dans certains cas très rares (à peine 1 pour 250) la vésicule forme une masse solide ne renfermant aucune trace de liquide. Elle possède la forme d'un ovoïde de grosseur variant d'un œuf de pigeon à celui de poule. Le poids oscille entre 25 et 115 grammes.

Par une ouverture longitudinale de la vésicule on constate une adhérence très intime entre les parois internes de celle-ci et son contenu; on ne parvient, en effet, qu'avec peine, à isoler la masse solide autour de laquelle la muqueuse cystique, gonflée, vitreuse forme une enveloppe complète de quelques millimètres d'épaisseur. Contrairement à ce qui se produit pour les concrétions organiques on ne remarque ici aucune trace d'organisation ou de striation zonaire. Il semble donc qu'il y ait eu, à un moment donné, une brusque oblitération du canal cystique amenant un dépôt des matières solides en solution après résorption de l'eau à travers les parois biliaires.

Au point de vue physiologique il s'agit bien, dans ces cas, de l'oblitération du canal cystique, pour plusieurs raisons: d'abord l'absence de corps étranger au centre ou dans la masse indique bien qu'il n'y a pas eu de noyau de formation, de centre autour duquel se seraient déposés progressivement les matériaux solides; puis la structure homogène éloigne l'idée d'accroissement par appositions successives; enfin la constatation de cette oblitération de la vésicule en est la meilleure preuve.

Dans huit cas examinés nous n'avons pu retrouver l'ouverture du canal cystique; dans un cas assez particulier le canal tout près de son embouchure était enserré par une plaque de tissu fibreux d'un demi-centimètre de large.

La vésicule biliaire a donc perdu tout rôle fonctionnel; d'ailleurs son produit est très notablement réduit et ses parois atrophiées. L'écoulement de la bile se fait par le canal accessoire.

A titre d'indication nous donnons les résultats de l'analyse du contenu d'une de ces vésicules.

Cette vésicule débarrassée des graisses et du parenchyme hépatique pèse 34 grammes.

Après ouverture, on extrait la part concrétée et on fait trois parts.

Poids de la paroi cystique = 12 grammes.

Poids de l'enveloppe muqueuse = 2,5; après dessiccation = 0,082.

Poids de la masse concrétée = 19,5.

Cette dernière partie est mise à sécher sous vide sulfurique. Pendant la dessiccation elle se fragmente en petites masses de la grosseur d'une tête

d'épingle. Quand la matière est complètement sèche, sa coloration est devenue grisâtre, entre les doigts elle s'effrite, sous le moindre effort, en une poussière grenue.

Poids après dessiccation = 6 gr. 4 Perte d'eau = 13,1

Pour 100 $\left\{ \begin{array}{l} \text{Résidu sec} = 32,85 \\ \text{H}^2\text{O} = 67,17 \end{array} \right.$

Le résidu sec soumis à un épuisement étheré dans un Soxhlet abandonne une très faible quantité de matières grasses.

Poids de l'extrait étheré = 0,23, et pour 100 = 3,59

La matière insoluble semble pauvre en sels biliaires, mais riche en substances azotées, car brûlée sur lame de platine, elle donne un charbon très foisonnant. Cendres nettement fusibles, blanches mais avec une légère teinte verdâtre.

3 gr. 338 de matière sont calcinés pour le dosage de la partie minérale et donnent : 0 gr. 218 de cendres (6,53 p. 100).

Les cendres solubles dans l'eau contiennent $\left\{ \begin{array}{l} \text{NaCl} = 0,074 \\ \text{Co}^3\text{No}^2 = 0,085 \end{array} \right.$

Dans les cendres insolubles on dose P^2O^5 $\left\{ \begin{array}{l} \text{P}^2\text{O}^5 = 0,02 \\ \text{et CaO} \quad \quad \quad \text{CaO} = 0,037. \end{array} \right.$

Traces de manganèse.

Si on fait les calculs pour 100 parties de cendres on obtient :

$\begin{array}{l} \text{NaCl} = 33,94 \\ \text{Co}^3\text{No}^2 = 38,98 \\ \text{P}^2\text{O}^5 = 9,17 \\ \text{CaO} = 16,96 \end{array}$

et pour 100 grammes de matière sèche :

$\begin{array}{l} \text{NaCl} = 2,21 \\ \text{Na}^2\text{O} = 1,46 \\ \text{P}^2\text{O}^5 = 0,59 \\ \text{CaO} = 1,10 \\ \text{Total} = 5,36 \end{array}$

Si on compare cette teneur en cendres à celle de la bile normale on constate qu'elle lui est légèrement inférieure.

En effet, dans ce dernier cas, la teneur en matières minérales s'élève à 8,53 pour 100 grammes de bile sèche.

Au cours des manipulations nécessitées par la récolte de la bile de porc, nous avons constaté un fait intéressant qui nous a conduit à une série de recherches.

Dans le contenu trouble de certaines vésicules il se produit par agitation des ondes soyeuses qui rappellent la présence de matières cristallisées. Ce phénomène, rare lorsqu'il s'agit

de vésicules renfermant un grand volume de liquide, peut s'observer cependant même dans ces cas, mais passe inaperçu à cause de la dilution. On le rend sensible en vidant avec précaution ces vésicules après un certain temps de repos ; les particules solides donnant naissance aux ondes soyeuses se trouvent accumulées dans les dernières portions de la bile.

Les vésicules de coloration grisâtre ou jaune blanchâtre, souvent remplies d'un magma boueux sont les plus favorables à ces observations. En effet, si on examine attentivement les caractères physiques de cette substance semi-solide, on constate qu'elle est soyeuse, brillante, avec des reflets moirés très nets.

Le microscope révèle la présence de très fines aiguilles aciculaires, extrêmement minces, flexueuses, qui par leur enchevêtrement forment un feutrage très serré. Il existe en même temps une abondante proportion de substances amorphes.

Ces observations n'ont pu être faites que pendant la saison froide. La température devait donc avoir une influence sur la formation de ces dépôts cristallins.

Nous avons cherché et réussi à obtenir artificiellement ce résultat par de simples abaissements de température. De la bile de porc parfaitement limpide peut, en effet, donner après un séjour à la chambre froide un précipité cristallin, mais très faible et très inférieur à ce qui se produit naturellement pendant l'hiver.

Une autre condition favorable également à la cristallisation est la concentration de la bile.

Si l'on soumet un faible volume de bile limpide à une évaporation lente, sous vide sulfurique, on arrive progressivement à une dessiccation totale sans obtenir autre chose qu'un résidu amorphe. Mais au contraire, si on concentre en plusieurs étapes, au $\frac{1}{5}$, au $\frac{1}{4}$, au $\frac{1}{3}$, et qu'on refroidisse chaque fois, on observe parfois la formation de cristaux. On réalise l'expérience de la façon suivante : un volume de bile est évaporé au bain-marie, au $\frac{1}{4}$ environ, et filtré à chaud, les

mucines ou pseudo-mucines coagulées en grande partie restent sur filtre. Le filtrat limpide mis à la glacière donne un fin précipité cristallin. Après séparation de ce dernier, on peut avoir une deuxième production de cristaux.

La température et la concentration sont donc deux conditions importantes.

A l'état naturel, le maximum de cristallisation correspond à la réalisation simultanée de ces deux conditions. En effet, c'est dans les vésicules les moins riches en bile que l'on trouve le dépôt cristallin le plus abondant lorsque la température est suffisamment basse sans atteindre cependant la congélation totale de la masse biliaire.

La récolte des cristaux aciculaires présente des difficultés dues à leur grande ténuité et aussi au mélange des matières amorphes.

La filtration sur filtre ordinaire demande beaucoup de temps ; sur filtre à succion une grande partie des aiguilles passe à travers le papier. La centrifugation permet mieux que tout autre procédé de séparer cristaux et précipités amorphes de la bile liquide.

Nous avons pu de cette façon obtenir ces cristaux en quantité suffisante pour déterminer leur nature.

La bile liquide surnageant le dépôt cristallin obtenu par repos au froid est décantée avec soin. On centrifuge le dépôt pour éliminer le plus de liquide possible. Le culot de matière solide est dissous dans un volume d'eau juste suffisant. On verse la liqueur, rendue trouble par la présence de flocons amorphes, dans une capsule de porcelaine et on ajoute du noir animal. Après chauffage au bain-marie on filtre chaud. Le filtrat, mis au froid, abandonne un fin précipité blanc soyeux, qui peu à peu augmente et tombe au fond du vase. L'examen microscopique montre qu'il est formé des mêmes cristaux que ceux rencontrés dans la bile.

Ainsi réunis en dépôt assez dense, ils peuvent être isolés sur filtre à succion, mais en prenant soin de verser la liqueur avant de faire le vide et de n'utiliser pour la filtration qu'une

très faible dépression. L'opération terminée, il reste sur filtre un dépôt blanc vitreux, de consistance pâteuse, qui se laisse détacher tant qu'il est encore humide.

Les cristaux, dans cette masse, sont agglutinés, feutrés. Dans une expérience, nous sommes partis de 1.500 centimètres cubes de bile de porc provenant de 29 vésicules. Après 24 heures de repos à la glacière, on a un dépôt qui, séparé du liquide clair, occupe un volume de 275 centimètres cubes. La centrifugation permet de réduire ce volume à 125 centimètres cubes. Recueillis, ces 125 centimètres cubes sont additionnés de 50 centimètres cubes d'eau distillée et de 10 gr. de noir animal. On chauffe le mélange quelque temps au bain-marie, puis on filtre la liqueur chaude. Il passe un liquide à peu près incolore qui est mis au frais. Deux heures après, se sont formés de minces voiles cristallins blancs, nacrés, adhérents aux parois du vase et qui tombent facilement au fond. Par filtration sous vide on obtient un gâteau cristallin pesant humide 54 gr.

La dessiccation lui enlève 33 o/o d'eau ; la matière est alors dure, cassante, de saveur amère.

Brûlée sur lame de platine, elle fond, s'étale comme une graisse, en répandant une forte odeur aromatique. Charbon très peu abondant en minces écailles, qui après calcination complète, laisse des cendres blanches, fusibles, formées uniquement d'alcalis carbonatés.

Trois grammes de cette substance sont calcinés pour la recherche du soufre d'après la technique suivante : la matière est mise dans une capsule de platine, puis humectée de lessive de potasse. On chauffe lentement ; il se fait une pâte homogène que l'on sèche et sur laquelle à la température du rouge sombre on projette des cristaux de nitrate de potasse. Le nitrate déflagre et réalise la combustion. Les cendres sont reprises par un grand volume d'eau distillée puis légèrement acidifiées par AzO^3H ; à l'ébullition on ajoute du nitrate de baryum.

On n'a obtenu dans ces conditions que des quantités importantes de sulfate de baryte.

La substance ainsi traitée n'était donc pas une matière soufrée.

La recherche de l'azote par calcination en présence de potasse solide donne lieu à un dégagement appréciable d' AzH^3 .

Le dosage de cet élément a été fait par la méthode de KJELDAHL :

Analyse d'azote

Matière I.	. . .	1,2345	Quantité d'azote =	0,0306
— II.	. . .	0,9710	—	= 0,023
		Pour 100 de matière (I)	=	2,47
		— — (II)	=	2,35

La teneur moyenne en azote est donc = 2,41

Ces résultats analytiques nous ont conduit à l'identification de cette substance biliaire avec le glycocholate de soude.

Il nous restait à chercher une méthode pratique de préparation de ce sel biliaire.

III. Glycocholate de soude cristallisé. — Nous venons de voir qu'en réalisant certaines conditions physiques, concentration, abaissement de température, on peut séparer à l'état cristallisé une petite quantité de glycocholate de soude.

Nous avons essayé la précipitation du sel biliaire par divers réactifs. Les sels à métaux lourds précipitent en masse les substances organiques contenues dans la bile ; il se produit une défécation totale. Les sels à métaux alcalins ajoutés à la bile, en solutions saturées, donnent un précipité tantôt très faible, tantôt abondant, mais toujours gélatineux et par suite difficile à filtrer. Dans tous les cas on isole une matière amorphe gorgée de substances minérales. L'action des acides minéraux a déjà été étudiée. Les acides organiques, en particulier l'acide acétique, redissolvent partiellement ou en totalité le précipité produit.

Parmi les bases minérales, les alcalino-terreux ne permettent pas de séparation.

Une série de considérations théoriques sur des analogies entre les acides biliaries et les acides gras nous ont conduit à étudier de près l'action des alcalis.

C'est tout d'abord une analogie de structure moléculaire entre l'acide cholalique ($C^{24}H^{40}O^5$ ou $C^{25}H^{40}O^5$), noyau fondamental des acides biliaries et les acides gras : laurique, myristique, stéarique... De part et d'autre il s'agit de longues chaînes grasses en C^{12} , C^{14} , C^{16} et C^{18} terminées les trois premières par un carboxyl, la quatrième par des groupements oxygénés inconnus, mais dont un est également un carboxyl. Dans ces différentes molécules, l'importance de ces fonctions oxygénées est donc relativement faible par rapport aux chaînes carburées.

Pour l'acide laurique (P. M. = 255) le carboxyl terminal représente 47 grammes, c'est-à-dire 16 o/o du poids de la molécule totale, tandis que le reste pèse 214 grammes c'est-à-dire 83,92 o/o de ce même total.

Acide myristique (P. M. = 228). Poids de la fonction oxygénée = 45, reste gras = 183.

Acide stéarique (P. M. = 284). Poids de la fonction oxygénée = 45, reste gras = 239.

Pour l'acide cholalique. Poids des fonctions oxygénées = 124, reste gras = 284 grammes.

Si l'on passe de ce dernier à son complexe originaire, l'acide glycocholique en C^{26} , c'est encore la chaîne grasse qui domine.

En second lieu les chlorures alcalins, en solution saturée, ont la propriété de précipiter les sels biliaries aussi bien que les sels des acides gras. Ce caractère signalé par PFLÜGER et appliqué par TENGSTRÖM et par M. A. GAUTHIER, rapproche donc les deux classes d'acides. Le relargage des savons est obtenu dans l'industrie par addition de lessives salées.

Enfin les sels biliaries jouissent de la même propriété que les savons, ce sont d'actifs solvants des graisses.

Or on sait qu'en présence d'alcalis en excès les solutions

concentrées de savons proprement dits donnent aisément des cristaux des sels alcalins des acides gras stéarique, etc.

Faites dans cette direction théorique et éclairées par nos précédents essais sur la cristallisation naturelle du glycocholate dans la bile, nos recherches expérimentales ont été couronnées de succès.

Nous avons indiqué plus haut (page 61) l'action des alcalis sur les solutions aqueuses de glycocholate cristallisé :

Précipitation à l'état amorphe en présence de lessives alcalines concentrées ;

Cristallisation en liqueurs étendues.

Cette dernière propriété du sel biliaire non soufré nous a permis d'instituer un mode de préparation que nous allons exposer brièvement :

La technique comprend trois points principaux :

Préparation de la bile.

Précipitation du glycocholate.

Récolte et purification du sel biliaire.

1. *Préparation de la bile.* — La bile de porc même recueillie aussitôt après l'abatage, nous l'avons dit, est rarement claire, limpide comme chez la plupart des autres animaux ; elle peut contenir en suspension des substances amorphes, cellules, fibrine, etc.

Dans un tel milieu hétérogène on ne peut tenter la précipitation du sel biliaire à l'aide de soude ou de potasse : on entraînerait trop d'impuretés difficiles à filtrer et à écarter ultérieurement.

Il est donc très important de rendre d'abord le liquide limpide à fin de suivre la marche de la précipitation alcaline.

Pour obtenir ce résultat deux moyens peuvent être tentés :

On peut essayer d'éliminer les impuretés solides en soumettant la bile à une filtration préalable.

Dans ce but la bile est additionnée du cinquième ou du quart de son volume d'eau distillée. Une grande partie des sels biliaires tenus en suspension à l'état amorphe ou cris-

tallisé passe dans la solution qui s'éclaircit notablement. En même temps la viscosité diminue et la filtration de la bile devient possible.

La technique la plus avantageuse consiste à chauffer la bile au bain-marie à 50° ou 60° ; la solubilisation des substances solides s'opère très rapidement.

Elle nous a conduit, en outre, à la précipitation des matières albuminoïdes par la chaleur. Si, en effet, on élève la température de 50° à 80° et qu'on prolonge pendant une demi-heure environ ce chauffage, on voit se former dans la masse liquide des flocons blanchâtres volumineux qui se réunissent et tombent au fond. On filtre la bile décantée encore chaude ; on obtient une belle liqueur claire de coloration jaune orangé.

C'est alors que peut être faite aisément la précipitation du glycocholate de soude.

2. *Précipitation du glycocholate.* — La bile ainsi préparée a une densité $d = 1016$ à $d = 1017$.

On se sert d'un récipient spécial devant permettre de recueillir facilement les précipitations alcalines.

On a choisi dans ce but une cloche en verre que l'on dispose renversée sur un trépied en bois. Au sommet de la courbure se trouve un goulot que traverse, grâce à un bouchon de caoutchouc, un tube de verre pouvant circuler dans toute la hauteur de la cloche. Celle-ci une fois en place, et le tube destiné au siphonage étant en haut de sa course on y verse la bile refroidie de préférence aux environs de 10°. On ajoute alors, par petites quantités, de la lessive de soude ordinaire. Il se produit de gros grumeaux blanchâtres, très lourds, qui gagnent aussitôt les parties inférieures.

Si on brasse vigoureusement la masse, ces grumeaux se fragmentent puis se redissolvent. Il est donc important d'agiter la liqueur en même temps qu'on ajoute la solution alcaline, on évite ainsi la formation de ces précipités amorphes.

Après addition d'un certain volume de base, la bile se trouble enfin, d'une façon uniforme ; dans toute la masse appa-

raissent des flocons blanchâtres, d'abord très petits, puis qui augmentent de volume et tombent dans la courbure de la cloche. Une nouvelle quantité de soude provoque un nouveau précipité et ainsi de suite jusqu'à cessation de précipité.

Il y a donc une étroite relation entre la quantité de soude versée et le poids de précipité qu'elle détermine.

Au début de l'expérience un faible volume de lessive suffit à provoquer un trouble abondant, puis il faut augmenter ce volume, enfin à un moment donné quelque soit la quantité ajoutée, plus rien ne se dépose.

On pourrait sans doute verser en une seule fois la soude nécessaire pour obtenir la précipitation totale. Il vaut mieux opérer en plusieurs fois et séparer chaque fraction obtenue.

La séparation se fait grâce au tube qui traverse la cloche. Lorsque le précipité du sel biliaires s'est déposé, on descend le tube au-dessous du niveau du liquide que l'on écoule ainsi par abaissement progressif jusqu'au dépôt blanchâtre. On remonte alors le tube et on vide le récipient pour un nouveau traitement.

Les premiers précipités sont les plus beaux, les plus purs ; ils sont blancs et soyeux. Le microscope les montre formés uniquement de longues aiguilles très minces, flexueuses, polarisant très activement la lumière.

Dans les dernières récoltes, il existe un mélange de matières amorphes et de cristaux petits, mal formés.

Si on continue à ajouter de la soude en excès il ne se produit d'abord aucune modification, puis de fines gouttelettes huileuses se forment bientôt et se réunissent à la surface en une couche verdâtre peu épaisse. C'est une matière amorphe renfermant de rares aiguilles cristallines.

La densité du mélange augmente bien entendu avec la quantité de lessive alcaline employée.

D'une densité variant de 1016 et 1017 on aboutit à des densités de 1115 et 1112.

Pour la précipitation, on peut employer indifféremment la soude ou la potasse ; nous préférons la soude puisque les sels

biliaires chez le porc sont à base de soude ; on évite ainsi la substitution partielle du potassium au sodium.

3. *Récolte et purification du glycocholate.* — On traite à part les premiers précipités qui sont beaucoup plus purs et moins riches en alcalis.

On les recueille sur filtre à succion en papier chardin, ou bien en papier poreux ordinaire mais soutenu par de la toile. Une faible pression suffit (20 mm. de mercure) au début, pour colmater le filtre ; on achève sous pression maxima.

On isole ainsi une pâte blanche, porcelanique, formée par le feutrage des aiguilles biliaires.

La purification s'obtient en la redissolvant dans un volume d'eau distillée à peu près égal au quart du volume de bile dont elle provient. La solution additionnée de noir animal est chauffée au bain-marie jusqu'à concentration convenable, c'est-à-dire jusqu'à ce que par refroidissement apparaissent des flocons blancs. On filtre rapidement à chaud pour retenir avec soin le noir ; la liqueur claire cristallise lentement.

On peut tenter une ou plusieurs recristallisations. En général, cela n'est pas nécessaire pour les produits de tête. Il faut y recourir pour les queues de précipitation pour deux raisons ; parce que à mesure que la teneur en soude augmente il se fait des entraînements plus importants de matières étrangères, en outre en même temps que le glycocholate cristallisé il se précipite du sel à l'état amorphe.

Pendant les cristallisations en série les premières eaux sont fréquemment colorées en vert par suite de modifications du pigment jaune orangé de la bile.

A aucun moment nous n'avons constaté le dégagement d'ammoniac.

Le sel biliaire n'est donc pas attaqué dans sa fonction amidé, il ne se produit pas non plus de saponification appréciable.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

I. — On part de 3 litres 500 de bile de porc provenant de 68 vésicules fraîches.

Bile trouble ; densité $d = 1019$.

On la chauffe à 50° au bain-marie ; une grande partie des matières solides en suspension passe en solution. On porte alors à 80° pendant une demi-heure. Il se fait un précipité albumineux, blanchâtre qu'on retient par filtration. Poids de cet insoluble = 25 grammes.

La bile est alors versée dans la cloche en vue de la précipitation alcaline ; on fait celle-ci en deux fois.

Dans un premier traitement on ajoute successivement les volumes suivants de soude :

1 ^o	120 centimètres cubes NaOH $d = 1135$		
2 ^o	135	—	—
3 ^o	100	—	—
4 ^o	98	—	—

A chaque addition de soude correspond un précipité de glycocholate cristallisé que l'on sépare aussitôt et que l'on essore à la trompe.

On réunit finalement les quatre précipités et on les dissout dans un litre et demi d'eau distillée. La liqueur est concentrée, au bain-marie, en présence de noir animal, à environ un litre. On filtre chaud et on sépare un premier jet de cristaux. Par évaporations et filtrations successives on sépare quatre échantillons qui après dessiccation pèsent 48, 39, 28 et 15 grammes.

Les queues de cristallisations acidifiées par HCl donnent un précipité amorphe pesant 19 grammes.

On continue la saturation de la bile par la soude et on ajoute à nouveau :

70 grammes de NaOH $d = 1035$		
95	—	—
125	—	—

Il ne se fait plus alors de cristallisation. Des gouttes huileuses se forment et viennent à la surface où elles se réunissent en une couche épaisse brun verdâtre.

Les recristallisations séparent :

27 grammes de glycocholate		
25	—	—
16	—	—

II. — On recueille le contenu de 162 vésicules formant un volume de 8.350 centimètres cubes de bile.

Après repos de 24 heures à la glacière, qui permet aux substances solides de se déposer, on décante 6.800 centimètres cubes de liquide clair de densité $d = 1017$.

On chauffe une demi-heure à 80 90° au bain-marie en agitant la masse. Des flocons blanchâtres se forment et tombent au fond.

On filtre à chaud la bile clarifiée.

Le précipité albuminoïde séché pèse 51 grammes.

Etant donné son volume, on partage le filtrat en deux parties dans lesquelles on fait la précipitation alcaline par la soude.

Liquueur A. On ajoute en trois fois	{	180 centimètres cubes de NaOH d = 1352		
		120	—	—
		100	—	—
Liquueur B. —	{	170	—	—
		130	—	—
		95	—	—

Chaque précipité est séparé, essoré à la trompe, réuni à son correspondant de série puis soumis à des cristallisations fractionnées.

On sépare 270 grammes de glycocholate cristallisé. Dans les eaux-mères il reste 44 grammes de matière que l'on précipite par l'acide chlorhydrique.

Les liqueurs A et B sont alors mélangées. On ajoute d'abord 250, puis 300 centimètres cubes de NaOH. Il ne se forme plus de sel cristallisé, mais un précipité huileux verdâtre.

On obtient à peine 92 grammes de sel biliaire.

Rendement. — Le rendement en glycocholate est environ de 50 à 60 o/o du sel total.

Il est le même avec la soude et la potasse.

Dans certaines expériences faites avec des solutions moindres de bile, on peut obtenir jusqu'à 70 o/o de sel biliaire.

Cette méthode de préparation a l'avantage de donner très rapidement une proportion élevée d'un produit biologique difficile à obtenir dans cet état de pureté.

La bile, après ce traitement, peut être soumise sans inconvénients à la méthode générale.

On neutralise les alcalis et on précipite par un excès d'acide ; on lave et on sèche.

Le résidu sec repris par l'alcool méthylique fort est traité par le métholate de baryte, etc.

IV. **Acide glycocholique (porc).** — On obtient l'acide glycocholique en partant du sel de soude cristallisé.

Le déplacement de la base par addition d'un acide minéral, pour libérer l'acide, exige certaines précautions.

A froid si on verse un acide minéral dans une solution de glococholate de soude, il se fait aussitôt un précipité blanchâtre, très volumineux, de texture gélatineuse rappelant la silice amorphe hydratée.

L'isolement et le lavage d'un tel produit est extrêmement long et pénible.

A chaud, les résultats sont meilleurs ; l'acide aussitôt précipité se ramollit et tombe au fond du vase sous forme de pâte plastique. Il vaut mieux cependant procéder de la façon suivante : le sel alcalin dissous dans un faible volume d'alcool est versé par très petites quantités en agitant, dans un grand excès d'eau contenant 10 o/o d'HCl.

L'acide biliaire précipite en donnant un louche qui disparaît lentement et se dépose. On le lave plusieurs fois dans de l'eau chaude, puis on le pulvérise et lave encore à froid jusqu'à complète neutralité des eaux.

Nous n'insisterons que sur les principales propriétés de cette substance.

1. *Propriétés physiques.* — L'acide glycocholique de la bile de porc est une résine blanche ou légèrement blonde, sèche, friable, cassante à froid, molle et plastique à chaud ; il se ramollit en effet dans l'eau bouillante et par refroidissement reprend sa texture grenue. Aux environs de 40° il possède les caractères de la pâte de guimauve et peut être étiré en longs filaments brillants, soyeux qui, à froid, perdent leur malléabilité en même temps que leur éclat.

Les auteurs attribuent à l'acide glococholique une saveur à la fois amère et sucrée.

Celui que nous préparons est totalement insipide lorsqu'il est pur.

Il y a deux sortes d'impuretés qui peuvent le souiller et lui donner une saveur désagréable ; c'est d'abord la présence de sel alcalin non décomposé et surtout d'acide taurocholique ou de taurocholate entraîné.

On évite ces substances étrangères par des cristallisations

fractionnées et une décomposition totale du glycocholate de soude.

La recherche et le dosage du S permet de déceler la présence et la proportion d'acide taurocholique et d'apprécier la pureté du produit.

L'acide glycocholique pur contient des traces négligeables de S; si, en effet, on en brûle 10 grammes en présence de soude et de AzO^3K d'après la technique que nous avons indiquée on obtient des quantités impondérables de sulfate de baryte.

Au contraire l'acide des queues de cristallisations donne des résultats positifs bien que très faibles.

I. — 10 grammes de matière ont donné par incinération en capsule de platine (NaOH et AzO^3K) et précipitation à l'état de sulfate de baryte :

$$\begin{array}{ll} \text{SO}^4\text{Ba} = 0,014 & \\ \text{S} = 0,0019 & \text{S o/o de matière} = 0,019 \end{array}$$

II. — 5 grammes d'un autre échantillon ont donné :

$$\begin{array}{ll} \text{SO}^4\text{Ba} = 0,008 & \\ \text{S}' = 0,0011 & \text{S o/o de matière} = 0,022 \end{array}$$

Nous avons rapproché ces chiffres de soufre de ceux obtenus par le dosage du soufre total de la bile claire ou de son dépôt boueux.

Partie limpide : 20 centimètres cubes sont évaporés à sec et brûlés en platine

$$\begin{array}{ll} \text{SO}^4\text{Ba obtenu} = 0,254 & \\ \text{S} = 0,0034 & \text{S o/o de bile sèche} = 0,113 \end{array}$$

Dépôt trouble : 20 centimètres cubes ont donné :

$$\begin{array}{ll} \text{SO}^4\text{Ba} = 0,116 & \\ \text{S} = 0,015 & \text{S o/o de bile sèche} = 0,150 \end{array}$$

L'acide glycocholique bien pur est donc sans saveur aucune ; sous la dent il craque comme une croute de pain.

Il ne possède pas d'odeur particulière.

Très soluble dans les alcools, il ne se dissout pas dans l'éther et extrêmement peu dans l'eau.

100 centimètres cubes d'eau à la température de 20° dissolvent 0 gr. 0049 d'acide glycocholique.

Point de fusion pris au bloc MACQUENNE; l'acide fond en se ramollissant à 150°.

Son pouvoir rotatoire spécifique est $\alpha_D = + 4^{\circ}57'$ en solution alcool éthylique pour des concentrations comprises entre 3 et 4 grammes et à la température moyenne de 18°.

Son pouvoir rotatoire moléculaire $= + 21^{\circ}54'$.

2. *Propriétés chimiques.* — L'analyse élémentaire a été faite sur la matière séchée à poids constant sur vide sulfurique :

Combustion

I. Matière.	0,2546	Acide carbonique = 0,6379
		Eau = 0,2148
II. Matière.	0,3282	Acide carbonique = 0,8252
		Eau = 0,2793

soit en centièmes :

I	II
C = 68,31	68,64
H = 9,37	9,44

Dosage de l'azote

Méthode de KJELDHAL :

I. Matière = 0,7256	Azote = 0,0195	o/o = 2,69
II. Matière = 0,5623	Azote = 0,0153	o/o = 2,72

Méthode de DUMAS :

I. Matière.	0,4932	} soit en centième : 2,65
Azote recueilli . . .	11,3	
Température	16,5	
Pression	756	

Ces résultats correspondent à la formule $C^{27}H^{45}NO^6$ pour :

C = 67,64
H = 9,39
O = 20,00
N = 2,92

La teneur en sodium du sel alcalin a été déterminée sur le glycocholate cristallisé obtenu plus haut.

On calcine le sel, on reprend par l'eau et on titre l'alcalinité en présence d'hélianthine.

I. Matière 1 gr. 0862.

Après incinération, poids des cendres = 0,1154.

p. 100 de matière = 10,68

On dissout les cendres et on fait un volume de 100 centimètres cubes.

25 centimètres cubes exigent 5,3 de $\text{SO}^4\text{H}^2 \text{ N}/10$
 25 — — — 5,25 —

c'est-à-dire 0,0482 de Na en moyenne

et p. 100 d'acide biliaire = 4,49

II. Matière 1 gr. 7149.

On a 0,1844 et cendres et p. 100 = 10,72.

On fait un volume V = 100 centimètres cubes.

25 centimètres cubes exigent 8,1 $\text{SO}^4\text{H}^2 \text{ N}/10$
 25 — — — 8,25 —

c'est-à dire 0,0758 de Na en moyenne

et p. 100 de matière = 4,41 de Na

L'acide glycocholique demande donc en moyenne 4,45 o/o de Na. C'est un acide monobasique.

Les sels de métaux lourds s'obtiennent par l'action des bases sur le glycocholate alcalin ou par double décomposition avec les sels de ces métaux.

Ils prennent la coloration de la base qui est entrée en réaction.

Tous sont solubles dans les alcools et peuvent cristalliser par évaporation lente ; le glycocholate de zinc en particulier s'obtient bien cristallisé par cette voie.

Les sels de chaux et de baryte sont purifiés par redissolution dans l'eau. On épuise par l'eau bouillante les sels amorphes et on filtre.

Pendant le refroidissement il se dépose d'abord des précipités amorphes que l'on sépare, puis par évaporation lente on recueille des croûtes blanches, d'un blanc nacré, formées d'aiguilles accolées.

Dosage du baryum par précipitation à l'état de SO^4Ba

I. Matière = 1,2537 SO^4Ba pesé = 0,3009 Ba o/o = 14,12
 II. Matière = 2,0182 SO^4Ba pesé = 0,4777 Ba o/o = 13,93

Le sel contient donc 14 o/o de baryum.

La réaction de l'acide glycocholique est neutre au tournesol.

Sa fonction est une fonction d'acide faible dont il reste à déterminer le degré au point de vue thermochimie. On peut dire cependant que cet acide est voisin des acides laurique, stéarique, etc.

Dans l'étude de l'acide glycocholique de la bile du porc il y a surtout deux propriétés importantes qui nous ont servi à le caractériser : 1° la facilité de cristallisation des glycocholates alcalins en liqueur neutre et surtout en présence d'alcalis ; 2° la scission hydrolytique en acide cholalique et glycocolle.

Nous avons longuement insisté sur la première puisqu'elle nous a servi de base à la préparation de l'acide glycocholique et de point de repère dans nos expériences sur la bile totale.

Il ne nous reste donc qu'à étudier la seconde.

C'est à STRECKER que revient l'honneur d'avoir réalisé le dédoublement de l'acide glycocholique, en soumettant à l'hydrolyse barytique le glycocholate de plomb. « Ce sel est chauffé pendant longtemps en présence d'une solution saturée à froid de baryte. La solution barytique reste claire et se prend par refroidissement en une masse cristalline. Si on reprend ce produit et qu'on le distille dans une cornue, on constate qu'il se dégage pendant toute l'opération de petites quantités d'ammoniac et que la vapeur d'eau entraîne des traces de composés d'odeur désagréable ; ce sont des produits de destruction du glycocolle. On obtient de la façon suivante le glycocolle et l'acide cholalique.

On prend le précipité de cholalate de baryte et on le traite par de l'acide chlorhydrique qui entraîne le baryum à l'état de chlorure et laisse l'acide cholalique insoluble sous forme de résine brune. La solution privée de cholalate de baryte par filtration est débarrassée de l'excès de $\text{Ba}(\text{OH})^2$ par Co^2 puis filtrée et traitée par HCl qui libère un peu d'acide cholalique. Le reste de Ba est précipité par addition de SO^4H^2 . Plusieurs chauffages du liquide en présence d'hydrate de plomb neutralisent HCl et SO^4H^2 en excès. Après précipitation par H^2S de l'oxyde de plomb dissous et filtration, l'évaporation de la solution donne des cristaux de glycocolle ».

Nous avons repris ces recherches en faisant varier les conditions d'hydrolyse et les agents hydrolysants, acides minéraux, bases alcalines et alcalino-terreuses.

3. *Hydrolyse acide.* — On emploie comme réactif l'acide sulfurique à des concentrations variées et comme solvant l'acide acétique, l'acide glycocholique étant, en effet, totalement insoluble dans l'eau.

L'expérience consiste à dissoudre un poids connu d'acide biliaire dans l'acide acétique fort puis à ajouter un certain volume de liqueur sulfurique titrée. Le mélange est chauffé au bain d'huile à l'ébullition.

Pendant la chauffe il se produit plus ou moins vite un louche d'abord très faible; on voit se former à la surface du liquide des traînées huileuses brunâtres, qui s'étalent, augmentent et se réunissent au fond du ballon en une masse, molle, pâteuse, de couleur blonde ou légèrement brune. L'attaque terminée on refroidit et on filtre pour séparer la matière insoluble. On sature l'acide sulfurique par la baryte, on sépare le sulfate de baryte et on concentre au bain-marie.

L'acide acétique est chassé par plusieurs additions d'eau suivies d'évaporations.

Enfin une dernière concentration donne le glycocolle cristallisé.

On sépare ainsi quantitativement : l'acide cholalique, le glycocolle et une petite quantité d'une substance brune, de saveur styptique, légèrement soluble dans l'eau, soluble dans les alcalis, insoluble dans les acides, que nous n'avons pu étudier.

Nous donnons les détails d'une série de quatre expériences.

	Acide glycocholique	Acide acétique concentré	Eau	SO ⁴ H ² pur	Hydrolyse à
I. . .	15 gr.	80 cm ³	50	5	10 0/0
II. . .	—	—	—	10	20 —
III. . .	—	—	—	15	30 —
IV. . .	—	—	—	20	40 —

On introduit dans quatre ballons de 250 centimètres cubes

15 grammes d'acide glycocholique pulvérisé, puis 80 centimètres cubes environ d'acide acétique concentré; par chauffage au bain-marie l'acide biliaire se dissout rapidement. Dans la liqueur que l'on maintient chaude on verse par petites quantités 50 centimètres cubes de solution sulfurique; il se fait chaque fois un trouble qui disparaît à chaud. Pratiquement on ne dépasse pas 40 à 45 centimètres cubes sans déterminer une précipitation partielle permanente.

Les quatre ballons munis de réfrigérants à reflux sont mis au bain d'huile.

L'ébullition se produit entre 135 et 140°. L'attaque n'est pas totalement identique dans chaque cas.

Dans les deux premiers ballons, c'est après la deuxième heure qu'apparaît un léger trouble, puis de petites quantités de matière huileuse brune qui monte à la surface. Vers la huitième heure la liqueur est redevenue limpide, tout l'acide cholalique insoluble s'est réuni au fond des ballons.

L'hydrolyse dans le ballon (n° 3) commence une heure après le début de l'ébullition et une demi-heure après dans le ballon (n° 4). La matière insoluble est plus foncée et possède une faible fluorescence verdâtre. Il s'est produit une très légère attaque de la substance comme l'indique une très petite quantité d'acide sulfureux.

On laisse refroidir les solutions et on étend d'eau pour précipiter l'acide cholalique resté en solution que l'on recueille sur filtre. Les eaux sont traitées par de la baryte pour précipiter l'acide sulfurique. Après filtration et lavage des sulfates de baryte, les jus d'hydrolyse sont concentrés au bain-marie, repris plusieurs fois par de l'eau pour éliminer l'acide acétique et concentré à cristallisation. Le glyocolle se dépose lentement en beaux cristaux qu'on sèche et pèse.

L'acide cholalique est pulvérisé, lavé et séché.

On obtient pour les quatre analyses :

	Acide cholalique	Glycocolle cristallisé	Résidu et pertes
I. . .	12,3	1,75	0,43
II. . .	12,1	1,72	0,95
III. . .	12	1,74	1,00
IV. . .	11,7	1,73	1,3

L'examen de ces résultats montre que l'hydrolyse se fait de la même façon à peu de chose près dans les quatre expériences.

Cependant on remarque que dans les deux dernières (III et IV) surtout le résidu est plus abondant ; en outre nous avons constaté la présence de petites quantités de SO^2 . Ces deux faits tendent à confirmer la vraisemblance d'une faible attaque de la substance par SO^4H^2 . En même temps le rendement en acide cholalique s'est un peu abaissé, et cette substance a subi une modification qui se traduit par une moindre insolubilité dans les alcalis. Elle tend à se transformer en dyslysine.

L'analyse élémentaire, comme nous le verrons plus tard, montre que les acides cholaliques obtenus ont subi une déshydratation partielle. Il devient probable que dans ces expériences l'hydrolyse, c'est-à-dire la scission en glycocolle et acide cholalique s'effectue très vite et que dans un deuxième temps qui correspond à l'insolubilisation de cet acide, il se produit une déshydratation de celui-ci.

Les quantités de glycocolle sont très sensiblement les mêmes.

Nous nous sommes placés d'ailleurs, pour l'obtenir, dans les mêmes conditions de dilution et de lavage des sulfates de baryte.

Si on rapporte ces poids à 100 grammes d'acide glycocholique on obtient les rendements suivants :

I. . .	11,69 de glycocolle cristallisé
II. . .	11,66 —
III. . .	11,45 —
IV. . .	11,47 —

Ces chiffres ne représentent pas la totalité de glyocolle séparé par hydrolyse ; la méthode d'isolement par cristallisation est, en effet, loin d'être rigoureuse, il y a un coefficient de perte pendant les manipulations.

Cependant les écarts ne sont pas très considérables ; si l'on transforme par le calcul, tout l'azote de l'acide glycocholique ($C^{27}H^{45}NO^6$) en glyocolle on trouve que le rendement théorique devrait être 13 gr. 15 o/o

4. *Hydrolyse par les alcalino-terreux.* — Comme STRECKER nous avons utilisé la baryte.

On verse dans une solution de baryte saturée à froid ou à chaud un poids connu d'acide glycocholique pulvérisé. On chauffe au bain d'huile à l'ébullition jusqu'à ce que l'hydrolyse soit achevée. L'acide cholalique est alors précipité à l'état de sel de baryum insoluble. On sépare par filtration le précipité de la liqueur claire et on traite séparément les deux.

Le sel organique de Ba est pulvérisé et traité par HCl qui dissout le baryum et libère l'acide cholalique sous forme d'une matière résineuse blonde à fonction acide.

Dans les eaux on sature la baryte par l'acide sulfurique ; le glyocolle est isolé par cristallisation en liqueur très légèrement acide.

α. Baryte en solution aqueuse saturée à chaud. — Dans un ballon de 500 centimètres cubes on verse 300 centimètres cubes de solution aqueuse de baryte saturée à l'ébullition, puis on ajoute 12 grammes d'acide glycocholique. On chauffe au bain d'huile.

La liqueur bout à 137° en donnant au début une mousse abondante.

Dès la troisième heure de chauffe la liqueur d'abord limpide se trouble ; il se fait de petits grumeaux qui se réunissent en masses sphériques, puis tombent au fond. Lorsque le précipité n'augmente plus on arrête l'opération qui demande douze heures environ.

On filtre la liqueur bouillante.

Les eaux d'hydrolyse et de lavage sont réunies et débar-

rassées de baryte par l'acide sulfurique qui libère en même temps de petites quantités de cholalate de Ba passé en solution. On évapore les eaux très légèrement acides.

Par concentration on obtient de gros cristaux de glyocolle ($P = 0$ gr. 85) et 0 gr. 35 d'une résine brune, de saveur amère et styptique, soluble dans les alcalis, insoluble dans les acides.

L'acide biliaire à l'état de sel de baryte est traité par HCl qui enlève le baryum.

Le faible rendement en glyocolle nous a conduit à doser l'azote dans cet acide biliaire.

Si on en chauffe un fragment en présence de lessive de potasse, on n'observe aucun dégagement d' AzH^3 .

Par calcination, au contraire, avec de la potasse solide, on obtient un départ très appréciable d' AzH^3 .

Dosage d'azote dans le résidu biliaire (méthode de KJELDAHL)

I. Matière 1,1209 :

$$\begin{aligned} Az &= 0,007 \\ Az \text{ o/o} &= 0,65 \end{aligned}$$

II. Matière 0,7265 :

$$\begin{aligned} Az &= 0,005 \\ Az \text{ o/o} &= 0,71 \end{aligned}$$

Cette proportion d'azote calculée en glyocolle, représente un peu moins de la moitié du glyocolle total.

Une deuxième expérience faite sur 15 grammes d'acide glycocholique a donné 0,92 de glyocolle.

β. *Baryte saturée à froid.* — A 350 centimètres cubes de baryte aqueuse saturée on ajoute 12 grammes d'acide biliaire en poudre. La dissolution ne devient complète qu'à chaud. On porte au bain d'huile, à 135-140°, 12 heures. Pendant toute la durée de l'expérience le dégagement de gaz a été surveillé par l'emploi d'un tube barométré au mercure. Après le départ d'air le mercure monté à une hauteur de 30 centimètres cubes est resté stationnaire jusqu'à la fin.

L'hydrolyse s'est donc faite à l'abri de l'air et ne s'est accompagnée d'aucune perte gazeuse.

On a obtenu 11 gr. 3 de sel organique de baryum et 0,83 de glyocolle.

Dans tous les cas la baryte joue donc le rôle d'agent hydrolysant, comme l'avait montré STRECKER, mais l'hydrolyse n'est pas totale.

En outre le glyocolle libéré n'a subi de la part de la baryte aucune réaction d'oxydation; on retrouve, en effet, la totalité de l'azote primitif.

C'est là une nouvelle confirmation des expériences faites antérieurement par MM. ETARD et A. VILA sur la non-attaque des acides amidés par la baryte à la pression ordinaire.

5. *Hydrolyse par les alcalis caustiques.* — Cette méthode donne des résultats très médiocres.

Dans une liqueur alcaline contenant 60 grammes de potasse solide pour 1000 centimètres cubes d'eau distillée on dissout 25 grammes d'acide glycocholique. Le mélange est chauffé à l'ébullition, en maintenant le niveau à peu près constant, pendant 40 heures. Après chaque période de chauffe de 10 heures on laisse refroidir et on constate une abondante cristallisation de glycocholate de potasse en aiguilles flexueuses caractéristiques.

Aucun dégagement d' AzH^3 ne se produit.

La recherche du glyocolle sur un échantillon de liqueur n'a donné aucun résultat positif.

On a alors recours au chauffage sous pression.

La solution alcaline d'acide biliaire est chauffée 30 heures en autoclave, à 130° sous deux atmosphères. Même dans ces conditions, il ne se produit aucune modification sensible; par refroidissement le sel de potasse cristallise fort bien.

On augmente la teneur en alcali que l'on porte de 60 grammes à 120 grammes puis on chauffe 20 heures à 140° sous deux atmosphères et demie de pression.

Dans ces conditions il ne se produit plus de cristallisation, et la liqueur a pris une coloration nettement brunâtre.

On étend à deux litres et on acidifie par SO^4H^2 . Il se dégage de fortes quantités de CO^2 et on recueille avec peine 12 gr. 85 de matière brune.

Les eaux débarrassées par cristallisation, des sulfates de soude, ne contiennent pas de glycocole.

L'hydrolyse par les alcalis caustiques ne se produit donc pas à la pression normale et pour des teneurs moyennes en base. Sous pression et en présence de fortes quantités d'alcalis, on dépasse les limites d'une simple hydrolyse; le glycocole en particulier est totalement oxydé.

V. Essais divers sur l'acide glycocholique. — Nous donnons en quelques lignes un court exposé de nombreux essais dont les résultats d'ailleurs sont peu intéressants.

1. *Distillation.* — La distillation de l'acide biliaire a été faite sur 15 grammes de matière séchée à poids constant.

On opère en ballon de WURTZ, sous 12 millimètres de mercure. Dans les premiers instants de chauffe il part des traces d'eau, puis la substance fond en une masse visqueuse. Vers 190° on voit se former un nuage blanchâtre de vapeurs qui se condensent en fines gouttelettes huileuses, de coloration jaune citrin; de l'eau est encore entraînée; puis la pression barométrique baisse fortement. A partir de 300° distillation d'une petite quantité d'huile blonde. La matière brunit; si on continue de chauffe on recueille des goudrons noirs sans intérêt.

2. *Calcination du glycocholate de calcium.* — On pulvérise 17 grammes de sel de chaux, que l'on mélange intimement à 50 grammes de sable fin. Le tout est réparti dans un tube de large diamètre, relié à une allonge refroidie par un courant d'eau, et disposé sur une grille à analyse.

On chauffe progressivement en commençant par la partie du tube la plus éloignée de l'allonge. Il se produit d'abord un léger boursofflement accompagné d'un départ de vapeur d'eau et d'huile blonde. Au petit rouge, la distillation devient

assez abondante ; dans l'allonge se réunit un goudron brunâtre.

Le distillat recueilli pèse 5 grammes et représente 33 o/o de la matière calcinée. C'est un mélange complexe totalement soluble dans l'éther. On le traite dans une boule à robinet par de la lessive alcaline. On sépare ainsi une huile, soluble dans l'éther et qui répand une forte odeur de phénol.

Le traitement par les acides donne de petites quantités de bases azotées.

La partie la plus importante est formée de carbures.

Les essais d'oxydation, de réduction, de benzoïlation, d'acétylation n'ont pas donné de résultats suffisamment concordants.

VI. Recherches biologiques sur le glycocholate de soude cristallisé. — 1. *Toxicité du glycocholate*. — Ces recherches ont été faites en collaboration avec notre regretté camarade et ami M. Guillaume Levêque, externe des hôpitaux de Paris. Elles avaient pour but surtout la recherche de la toxicité du glycocholate de soude et en même temps l'étude des réactions que provoque son introduction dans l'organisme.

Nous avons expérimenté sur les petits animaux de laboratoire (lapins, cobayes) et sur certaines espèces d'invertébrés appartenant aux genres : *planorbis*, *lynmea*, *hirudo*, *glossiphonia*.

1. *Animaux de laboratoire. Cobayes*. — On utilise des solutions faibles de sel biliaire (2 o/o) pour les injections intra-musculaires, et des solutions concentrées (10 o/o) pour les injections hypodermiques et intra-péritonéales. Ces dernières exigent certaines précautions ; la solubilité du glycocholate étant inférieure à 10 o/o à la température de 15°, elles doivent être préparées à chaud. Pour la même raison il faut, avant de les injecter, les porter à 37° au bain-marie ; cette température suffit pour faire passer en solution les cristaux formés à froid. On réalise de préférence des liqueurs riches pour réduire au minimum le volume injecté, précaution utile quand il s'agit de petits animaux.

Injectons hypodermiques. — Elles sont faites à la seringue avec des solutions à 10 o/o. On injecte 4 centimètres cubes au maximum dans la même région pour éviter des décollements trop considérables,

Première série : 4 août, cobaye n° 1 (poids = 405 gr.), reçoit 7 centimètres cubes sous la peau des cuisses, 4 centimètres cubes à droite, 3 centimètres cubes à gauche.

Le 5, œdème assez sensible aux deux points d'inoculation, surtout à droite.

Le 6, sensibilité moindre à gauche, augmentée à droite.

Le 7, l'œdème s'indure à gauche pour ne laisser qu'un noyau de sclérose sous-cutané; à droite ramollissement central, suintement épidermique.

Le 8, 9 et 10, délimitation d'un foyer de nécrose, puis élimination d'une eschare de la dimension d'une pièce de 50 centimes, faible suppuration.

Les jours suivants bourgeonnement rapide qui aboutit à la cicatrisation.

Le sujet guérit après fort amaigrissement.

Cobaye n° 2 (poids = 347), reçoit 4 centimètres cubes sous chaque cuisse; 8 heures après, œdèmes chauds sensibles; l'animal est triste et refuse toute nourriture; grand affaiblissement.

Le 5, on trouve le sujet mort dans sa cage.

Autopsie : Léger œdème incolore des régions inguinales.

Aucune lésion viscérale, urine claire.

Cobaye n° 3 (poids = 430). Injection de 10 centimètres cubes, 4 centimètres cubes sous chaque cuisse, 2 centimètres cubes en arrière de l'épaule gauche.

Le 5, œdèmes au niveau des cuisses, très faible en arrière de l'épaule.

Le 6, vive sensibilité, perte de l'appétit.

Le 7, suintement sous-épidermique avec ramollissement de la peau à gauche.

Le 8 au matin, mort.

Autopsie : Lésions cutanées, phacèle de la peau à gauche, viscères intacts, urine incolore.

Cobaye n° 4 (poids = 415), reçoit dans 9 centimètres cubes dans les mêmes régions, symptômes identiques, mort le 9.

Autopsie : Œdèmes gélatineux, blanchâtres avec nécrose centrale, présence dans la cavité abdominale d'un peu de sérosité rougeâtre.

Deuxième série : 16 août, cobaye n° 5 (poids = 460), reçoit 10 centimètres cubes en trois injections.

• Œdèmes douloureux dont deux s'atténuent et évoluent vers l'induration fibreuse, le troisième se termine par une nécrose peu étendue.

La cicatrisation se fait en quelques jours.

Cobaye n° 6 (poids = 455). On injecte 11 centimètres cubes en quatre endroits.

Le 17 on note de l'abattement, des œdèmes peu étendus. La guérison est obtenue en quelques jours sans lésion suppurative.

Cobaye n° 7 (poids = 360). 9 centimètres cubes sont introduits au niveau des cuisses; 8 heures après, symptômes inflammatoires très accentués; état général mauvais, anorexie complète, poils hérissés.

La mort arrive en 36 heures.

Autopsie : Œdèmes incolores à la périphérie, légère congestion des reins, urine normale.

Cobaye n° 8 (poids = 400). 11 centimètres cubes en trois injections, très vite les œdèmes apparaissent causant de vives douleurs et une immobilisation complète du sujet; mort en 30 heures.

Autopsie : Aucune autre lésion que les œdèmes locaux.

Cobaye n° 9 (poids = 380). Injection de 7 centimètres cubes dans trois régions; phénomènes inflammatoires peu accusés; guérison rapide sans nécrose.

Il résulte de ces expériences que le caractère général des lésions provoquées par l'injection de glycocholate est la formation d'œdèmes. Ces œdèmes, lorsque l'animal résiste, parcourent le cycle évolutif classique : cicatrisation fibreuse, ou nécrose massive des tissus. Même dans les cas de mort il y a peu de retentissement sur les organes internes; parfois une faible exsudation intra-péritonéale et une légère congestion du parenchyme cortical du rein.

Si on calcule la dose mortelle, on trouve que pour tuer un cobaye du poids moyen de 390 grammes il faut injecter 10 centimètres cubes de la solution à 10 o/o de sel biliaire, c'est-à-dire 1 gramme de sel sec.

La dose toxique par la voie hypodermique est donc de 0 gr. 282 pour 100 grammes de cobaye.

Injections intra-musculaires. — Elles sont faites dans l'épaisseur de la cuisse (solutions à 2 o/o).

26 août, cobaye n° 10 (poids = 338), reçoit 1 centimètre cube de solution dans chaque cuisse.

Léger œdème à peine sensible, puis guérison.

Cobaye n° 11 (poids = 400). On injecte 2 centimètres cubes de chaque côté. Le lendemain, fort engorgement des deux cuisses; gêne dans la marche.

La guérison survient sans accident.

Cobaye n° 12 (poids = 440). Injection de 2 cm³ 5 dans chaque cuisse mêmes symptômes suivis de guérison

Ces expériences ne donnent donc aucun résultat intéressant.

Injections intra-péritonéales. — Solutions à 10 o/o.

2 septembre, cobaye n° 13 (poids = 365), reçoit 5 centimètres cubes.

Le 3, parois abdominales tendues, sensibles; appétit diminué, mouvements pénibles.

Le 4, même état, affaiblissement général plus marqué.

Le 5, ces symptômes s'atténuent, appétit reparaît.

La guérison se poursuit dans les jours suivants.

Cobaye n° 14 (poids = 350), reçoit 6 centimètres cubes.

On note surtout des phénomènes généraux graves; stupeur, frissons; anorexie complète, mort en 22 heures.

Autopsie : Sérosité rosée dans le péritoine; reins congestionnés; urine normale.

Cobaye n° 15 (poids = 380). On injecte 4 cm³ 5.

Après la réaction locale au niveau de l'abdomen la guérison survient en 5 jours.

Cobaye n° 16 (poids = 400), reçoit 7 centimètres cubes. La mort arrive en 24 heures dans le coma.

Autopsie : Même exsudation en péritoine et congestion rénale.

Cobaye n° 17 (poids = 420), reçoit 7 centimètres cubes et cobaye n° 18 (poids = 340) 6 centimètres cubes.

Ils succombent le premier 40 heures et le deuxième 15 heures après les injections.

Les lésions dans tous ces cas sont identiques et toujours discrètes.

Si on calcule la dose mortelle, on trouve qu'il faut injecter 6 cm³ 5 d'une solution à 10 o/o de glycocholate, c'est-à-dire 0 gr. 65 de sel biliaire sec pour tuer un cobaye moyen pesant 377 grammes.

Pour 100 grammes de cobaye la dose toxique est donc égale à 0,172.

Lapins. Injections hypodermiques. On injecte la solution à 10 o/o de sel. — Lapin n° 1 (poids = 2.100), reçoit 20 centimètres cubes en quatre injections.

Le lendemain, œdèmes peu accentués presque indolores.

Les jours suivants ils diminuent puis donnent naissance à des flots fibreux.

Lapin n° 2 (poids = 2.000). Injections de 25 centimètres cubes; mêmes lésions; guérison rapide.

Lapin n° 3 (poids = 1.800), reçoit 21 centimètres cubes, dont 15 centimètres cubes sous la peau du ventre. Il se fait à ce niveau un vaste plastron œdémateux qui aboutit à un ilot de gangrène à droite. Symptômes généraux graves; vives douleurs, affaiblissement, anorexie.

Après élimination de l'eschare, tout rentre progressivement dans l'ordre.

Lapin n° 4 (poids = 2.100); 30 centimètres cubes en cinq régions; œdèmes qui évoluent rapidement vers la guérison par sclérose.

Le lapin résiste donc aisément à des doses élevées de glycocholate injecté par la voie hypodermique.

Des quantités égales à 2 gr. 5 et 3 grammes de sel biliaire ne provoquent que des lésions bénignes qui guérissent vite.

Nous sommes assez loin des conclusions de MM. BOUCHARD et TOPREL qui fixent à 0,54 la dose toxique du glycocholate de soude par kilogramme de lapin.

Nos expériences montrent que cette limite peut être reculée et reportée au delà de 1 gr. 25 par kilogramme d'animal

Injections intraveineuses. — Elles sont faites lentement dans les veines auriculaires et marginales avec des solutions de même titre.

Lapin n° 5 (poids = 1.750), reçoit le même jour (1^{er} octobre) 5 centimètres cubes dans la veine marginale droite et 7 centimètres cubes dans la veine auriculaire du même côté. Aussitôt après l'injection le sujet se débat et pousse des cris aigus; la respiration devient très accélérée, sac-

cadée; le cœur bat extrêmement vite. Ces symptômes d'excitation générale durent 15 minutes environ et cessent progressivement.

Le 2, rien d'anormal au niveau de l'oreille injectée, ni au point de vue général; appétit conservé; urines normales.

Le 4 on injecte de nouveau 10 centimètres cubes à l'oreille opposée, 5 centimètres cubes dans chaque veine auriculaire et marginale; mêmes phénomènes d'excitation mais moins accusés.

Lapin n° 6 (poids = 2.000), reçoit 15 centimètres cubes en deux fois, 10 centimètres cubes dans une veine, 5 dans l'autre.

Absence de lésions locales; mêmes manifestations générales fugaces.

Lapin n° 7 (poids = 1.500). On injecte 18 centimètres cubes, 8 à droite, 10 à gauche; même réaction, avec en plus un petit œdème suivi de nécrose par suite d'une légère injection accidentelle dans le tissu conjonctif péri-veineux.

Lapin n° 8 (poids 1.600), reçoit 11 centimètres cubes. La période d'excitation a duré plus longtemps chez ce sujet qui semblait moins vigoureux.

Ces expériences montrent donc que par la voie intraveineuse un lapin du poids moyen de 1.712 grammes peut recevoir sans succomber plus de 17 cm³ 7 de solution de sel biliaire à 10 o/o, c'est-à-dire en poids 1 gr. 77 de matière sèche.

La dose toxique pour 1 000 grammes de lapin est donc supérieure à 1 o34 et par suite notablement plus élevée que la dose classique malgré le mode d'administration par la voie sanguine qui est certainement le plus sévère et le plus brutal de tous.

2. *Animaux inférieurs.* — Ces animaux provenaient du laboratoire de M. le professeur JOUBIN, du Muséum.

Nous avons cherché à étudier leur sensibilité vis-à-vis du glycocholate de soude et à déterminer la toxicité de ce sel.

Ces expériences sont réalisées en ajoutant une quantité donnée de sel biliaire dans des volumes connus d'eau non distillée contenant ces êtres, avec des algues comme aliments. L'addition du glycocholate provoque la formation d'un léger précipité de sel de chaux insoluble qui se dépose.

α) Dans deux litres d'eau on ajoute suffisamment de glycocholate pour obtenir une solution à 1 o/o de sel biliaire.

On dépose dans la liqueur	{	3 planorbes (<i>planorbis cornua</i>).
		4 lymnées (<i>lymnea limosa</i>).
		2 — (— <i>palustris</i>).
		1 glossiphonie.

Le lendemain ces êtres éprouvent du malaise; les planorbes et les lymnées, après avoir fait des efforts pour s'éloigner du milieu, restent immobiles, se rétractent définitivement et meurent en deux jours.

La glossiphonie nage vivement en tous sens, puis elle perd sa vigueur et succombe le troisième jour.

β) On fait une solution à 1 pour 150 de glycocholate de soude dans laquelle on place :

- 4 lymnées (*lym. limosa*).
5 — (— *palustris*).
2 sangsues (*hirudo officinalis*).

Le lendemain 5 lymnées sont mortes, les 4 autres sont immobiles mais encore vivantes; elles succombent à leur tour 24 heures après.

Les deux sangsues sont tuées en 36 heures; c'est la mobilité qui disparaît la première, puis la sensibilité en même temps que la vie.

7) Solution de glycocholate à 1 pour 200 :

- 4 lymnées (*l. palustris*).
2 — (*l. limosa*).

Toutes meurent en trois jours.

δ) Solution à 1,66 pour 1.000, 1^{er} août :

- 6 planorbes (*planorb. cornua*).
2 lymnées (*lym. palustris*).
2 sangsues (*hirudo off.*), l'une de petite taille, l'autre

adulte.

Du 2 au 4, rien de particulier sauf une légère diminution d'activité; les planorbes et les lymnées se sont fixées sur les parois du récipient et restent immobiles. La petite sangsue ne se déplace que sous l'influence des excitations.

Le 5, les planorbes et les lymnées ont succombé ainsi que la petite sangsue.

La grosse sangsue a conservé sa vigueur.

ε) Solution à 5 pour 1.000.

3 sangsues de bonne taille sont tuées en 4 jours.

La toxicité pour les lymnées et les planorbes est donc fixée par l'expérience (δ); la solution contenait 1,66 o/o de sel biliaire.

Pour les sangsues il faut une plus forte concentration : 5 o/oo de glycocholate.

2. *Pouvoir hémolytique.* — La question de l'hémolyse sous l'influence des sels biliaires présente un grand intérêt au point de vue théorique et surtout au point de vue de la pathologie générale.

On admet, en effet, que c'est à leur action sur les hématies que doit être rapportée une grande part de leur toxicité. Lorsque au cours des affections hépatiques ces sels sont déversés, en quantité anormale, dans la circulation, ils provoquent la libération d'hémoglobine qui évolue vers son terme normal, la bilirubine et les pigments biliaires qui en dérivent.

Peu de travaux ont été faits sur l'hémolyse *in vitro*. Nous

citerons les recherches de VON DUSCH sur les acides biliaires, de Rywosch sur la toxicité hémolytique des différents sels biliaires (d'après lui l'hyoglycocholate serait quatre fois plus toxique que le glycocholate et ce dernier douze fois moins toxique que le taurocholate), enfin d'ARRHÉNIUS sur la rapidité d'hémolyse sous l'influence des sels biliaires : « le degré d'hémolyse croîtrait plus rapidement que le carré de la concentration du sel biliaire ».

Nous avons repris ces recherches pour chacun des deux sels biliaires cristallisés.

Nous nous sommes servis de globules de cobayes débarrassés du sérum sanguin par trois lavages successifs dans l'eau salée à 8,5 o/oo. A une émulsion de ces globules dans le sérum physiologique on a ajouté des volumes connus de solutions titrées de glycocholate cristallisé.

Première série d'expériences : On utilise une solution à 1 o/o de sel biliaire.

Solution de glycocholate à 1 0|0

Solution physiologique de NaCl = 5 cc.	Tube témoin	Tubes + solution de sel biliaire										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Emulsion globulaire = 0 cc., 2		0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6

Après quatre heures de contact à l'étuve à 37°, aucune trace d'hémolyse n'a été observée.

Deuxième série : Même concentration en sel actif.

Solution de glycocholate à 1 0|0

Solution physiologique = 5 cm ³	Tube témoin	Tubes + solution de sel biliaire										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Emulsion globulaire = 0 cc., 2		0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7	8

Conditions identiques de séjour à l'étuve, résultats négatifs.

Troisième série : On fait une solution à 6 o/o de sel biliaire, titre qu'on ne peut dépasser à cause du peu de solubilité de la substance.

Solution de glycocholate à 6 0/0

	Témoin	Tubes + solution du sel biliaire											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
Solution physiologique = 5 cm ³	. . .												
Emulsion globulaire = 0 cc, 2.	. . .	0 cc, 2	1 cc.	1 cc., 5	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Après trois heures d'étuve, il ne s'est produit aucune hémolyse ; on conserve cependant jusqu'au lendemain à + 10°.

On constate alors que dans le tube témoin et les tubes I, II et III les hématies se sont déposées ; le liquide surnageant restant parfaitement clair.

Dans tous les autres tubes, il existe un trouble uniforme sauf au niveau supérieur et sur une hauteur de quelques millimètres où le liquide limpide est coloré en rouge dont l'intensité va en croissant avec la teneur en sel biliaire.

Le trouble des parties inférieures s'explique par la cristallisation du glycocholate. L'examen microscopique montre, en effet, la présence de très belles aiguilles cristallines bien connues.

Les hématies sont conservées dans les quatre premiers tubes avec leur forme, leur plasticité normales.

Il ne reste plus, dans les autres, que des stromas.

L'hémolyse se produit donc à partir d'une certaine concentration et après un temps relativement long.

Il est d'ailleurs difficile de fixer exactement, dans ce résultat, la part du glycocholate dont la faible solubilité nécessite une dilution relativement grande, défavorable par elle-même à l'intégrité globulaire.

On peut cependant tirer de ces expériences une conclusion importante, c'est que la toxicité hémolytique du glycocholate très faible *in vitro* a toute chance de l'être aussi *in vivo*.

CHAPITRE II

TAUROCHOLATES

I. Historique. — En dehors de la bile cristallisée de PLATTNER qui est un mélange de glycocholate et de taurocholate alcalins, il semble bien qu'avant PARKE on n'ait pas obtenu à l'état cristallisé les taurocholates et l'acide taurocholique de la bile.

Cet auteur, qui était un élève de HOPPE-SEYLER, prépara à partir de la bile de chien des cristaux qu'il regardait comme étant des cristaux d'acide taurocholique.

Il partait de la bile décolorée de cet animal, dont il faisait une solution aqueuse qu'il traitait, suivant la technique de STRECKER, par de l'acétate de plomb ammoniacal. Le précipité obtenu était bouilli avec de l'alcool absolu. La solution alcoolique était saturée d'hydrogène sulfuré pour précipiter la totalité du plomb. Après filtration du sulfure de plomb, PARKE concentrait la liqueur alcoolique qui était alors additionnée d'éther en excès. Le précipité éthéré d'abord visqueux se transformait lentement, mais incomplètement, en aiguilles brillantes. PARKE ne put isoler ces cristaux de leur gangue amorphe. Sous l'influence de la dessiccation, toute cristallisation disparaissait. Pour lui, néanmoins, ces aiguilles soyeuses étaient bien des cristaux d'acide taurocholique ; ils donnaient par hydrolyse de l'acide cholalique et de la taurine.

HAMMARSTEN critiquant les expériences de cet auteur lui reproche de n'avoir pas indiqué la teneur en soufre de ces cristaux. Il doute qu'il ait eu en main le véritable acide tau-

rocholique ordinaire cristallisé à l'état pur, et pense que dans la masse partiellement amorphe il devait exister à côté de l'acide taurocholique classique un autre acide soufré, l'*acide taurocholéinique*.

Ce savant physiologiste, dans une longue série de remarquables travaux, étudie de nouvelles méthodes de préparation des acides biliaires, en s'appuyant sur les résultats obtenus par TENGSTRÖM dans la séparation des glycocholates et des taurocholates sous l'influence des sels.

Nous avons vu déjà le rôle de certains sels des métaux lourds, acétate neutre et acétate basique de plomb, alun de potasse, chlorure ferrique. Nous insisterons ici sur ce fait inattendu que l'action d'autres sels, en particulier des sels neutres alcalins, peut être différente suivant la base métallique et suivant qu'on les met en présence de solutions de sels biliaires ou de bile nature. TENGSTRÖM, dans ces essais, se servait de solutions à 2 o/o de sels biliaires. En ajoutant à ces solutions des sels neutres alcalins, jusqu'à saturation, il obtenait les résultats suivants :

Le chlorhydrate d'ammoniac, le nitrate et le sulfate de potassium ne provoquent aucune précipitation.

Les deux sels biliaires sont au contraire insolubilisés par le nitrate de soude ; il se forme une gelée compacte, impossible à filtrer et à laver.

Le chlorure de potassium précipite abondamment les taurocholates, pas du tout les glycocholates.

Les acétates de sodium et de potassium précipitent seulement les taurocholates.

Les carbonates alcalins, de même que les sulfates d' AzII^3 et de magnésie insolubilisent les deux sels biliaires.

C'est le rôle du chlorure de sodium qui est le plus intéressant. Dans des solutions séparées de glycocholates et de taurocholates, le sel ajouté à saturation provoque un double précipité, comme l'avait déjà constaté PFLÜGER.

Sur un mélange des deux sels biliaires faits dans les proportions de 1 à 4, 2 à 3, 3 à 4, il se produit également un pré-

cipité, mais d'autant plus abondant que la teneur en taurocholate est plus élevée.

Les résultats ne sont pas les mêmes si l'on opère sur la bile nature. En effet, l'addition de sel marin à des biles riches en sels soufrés, tantôt précipite ces sels, tantôt au contraire les laisse en solution. Par exemple, les biles de bœuf, de chien, de petite morue (DORSCH) se comportent très différemment.

Tandis que les deux premières ne donnent aucun précipité, celle de morue précipite abondamment.

TENGSTRÖM (1) en tire cette conclusion (sans autre démonstration) que cette différence tient à la différence des taurocholates contenus dans chacune de ces biles.

Ces résultats incertains l'ont conduit à fixer une technique spéciale pour chaque bile.

1. Bile de petite morue. — On traite directement cette bile par une solution saturée de sel marin; du premier coup il se produit un abondant précipité amorphe presque blanc; les pigments passent dans le filtrat et avec eux à peine 0,12 0/0 de sels biliaires. Le précipité recueilli sur filtre est lavé avec la solution salée saturée, puis pressé, séché et enfin dissous dans l'alcool fort pour éliminer la presque totalité du sel marin. Le taurocholate isolé à l'état amorphe contient 5,95 0/0 de S (dosage par calcination en présence de KOH et AzO^3K).

2. Bile de bœuf. — La bile doit être précipitée d'abord par l'acétate neutre de plomb, puis par le chlorure ferrique. Dans le filtrat, l'excès de Fe^2Cl^6 est insolubilisé par du carbonate de soude qui lui-même est saturé par l'acide chlorhydrique. C'est alors que dans la liqueur filtrée on ajoute le sel à saturation. Le taurocholate précipite, mais est légèrement souillé de glycocholate. Pour le purifier, on peut à plusieurs reprises le dissoudre dans l'eau, puis le traiter avec Fe^2Cl^6 , Co^3Na^2 , HCl et le reprécipiter par le chlorure de sodium.

TENGSTRÖM a isolé, par cette longue suite de manipulations,

(1) TENGSTRÖM, *loco citato*.

un produit contenant 5,94 o/o de soufre, ce qui pour lui, correspondait à une teneur de 99,4 o/o de taurocholate.

HAMMARSTEN (1) à son tour a appliqué la technique de son élève à la bile de bœuf, de morue (DORSCH) et de chien, en lui faisant subir des modifications de détail.

La bile de bœuf, après un traitement par l'acétate de plomb, et le chlorure ferrique, est précipitée non par le NaCl, mais par le chlorure de potassium. On dissout 34 grammes de KCl dans 100 centimètres cubes d'eau, puis on verse dans la solution biliaire chauffée presque jusqu'à l'ébullition. La liqueur est filtrée chaude, par refroidissement le taurocholate précipité en gros flocons. La teneur en soufre s'élève à 5,79 o/o, il serait impur et contiendrait de petites quantités de *taurocholénate*.

La bile de morue est soumise à l'action du chlorure ferrique avant la précipitation par le sel marin.

3. Bile de chien. — La bile de chien est recueillie dans un excès d'alcool en vue de sa conservation. Au moment de l'emploi on filtre et sèche au bain-marie. Le résidu est dissous dans l'alcool fort et cette solution additionnée d'éther en agitant. Les sels biliaires sont ainsi précipités. On les redissout dans l'eau, et on traite par Fe^2Cl^6 puis par NaCl.

On sépare ainsi une matière d'odeur écœurante, de saveur très amère en même temps que douce. HAMMARSTEN croit à l'existence de deux acides : acide taurocholique ordinaire de saveur amère et *acide taurocholénique* de saveur plutôt douce.

Par une série de précipitations ménagées à l'aide de Fe^2Cl^6 il serait arrivé à séparer la matière en deux portions ; les premières contiendraient l'acide ordinaire, les autres l'*acide taurocholénique*.

Il ne s'agit là, à notre avis, que d'une hypothèse qui est restée et devait rester non vérifiée, étant données les faibles quantités de bile traitée (HAMMARSTEN ne disposait que de 100 centimètres cubes de bile de chien à la fois).

(1) HAMMARSTEN, *loco citato*.

Le taurocholate amorphe étant isolé par la méthode de TENGSTRÖM, HAMMARSTEN prépare l'acide à l'état cristallisé, en utilisant la technique de PLATTNER dans ses grands traits.

Les taurocholates de bile de chien et surtout de petite morue se prêtent à cette cristallisation, ceux de bile de bœuf ne lui ont donné que des insuccès.

Nous décrirons rapidement le procédé d'HOMMARSTEN pour la bile de morue.

On part du taurocholate amorphe réputé pur, contenant 5,9 o/o de soufre, alors que la teneur du sel théorique doit être de 5,96 o/o. On en fait une solution à 2 o/o dans de l'eau chlorhydrique à 2 o/o également d'acide; on ajoute du chlorure de sodium finement pulvérisé. Il se fait très vite un faible précipité d'acide taurocholique ou de son sel de soude. On filtre et on additionne d'éther en agitant vivement.

Après quelques heures il se fait des aiguilles blanches et la masse entière, le lendemain, est transformée en cristaux. Ceux-ci sont filtrés sur trompe et pressés entre des doubles de papier. La liqueur qui passe cristallise à nouveau si on la traite comme plus haut.

Si on dissout ces cristaux dans l'alcool aqueux et qu'on ajoute à la solution de l'éther jusqu'à opalescence on obtient une abondante cristallisation qui peut être renouvelée plusieurs fois par additions d'éther suivies de filtration. Les cristaux isolés de ce milieu alcoolique aqueux sont stables à l'air. Si au contraire on se sert d'alcool absolu on constate que l'addition d'éther donne non pas un précipité cristallin, mais un précipité amorphe qui, abandonné à lui-même, ne se modifie pas. Cette substance est également stable à l'air, peut être desséchée, pulvérisée et conservée ainsi; elle est comparable, d'après l'auteur, aux substances cristallisées de PARKE. C'est l'acide taurocholique amorphe; il est très soluble dans l'eau et l'alcool; sa réaction est très acide, brûlé il ne laisse presque pas de cendres.

On peut donc obtenir ainsi l'acide biliaire soufré sous deux formes, amorphe ou cristallisé.

D'après HAMMARSTEN les différences de forme tiennent à l'absence ou à la présence d'eau dans les liqueurs mères de cristallisation ; en effet, si on prend de l'acide amorphe, qu'on le dissout dans l'alcool absolu et qu'on y ajoute une petite quantité d'eau avant l'éther, on obtient des aiguilles cristallines. Au contraire, si à une solution alcoolique d'acide cristallisé on ajoute de l'éther sans eau il se fait un précipité amorphe.

La forme des cristaux varie suivant la vitesse de leur formation, ce sont des prismes à quatre faces égales lorsqu'elle est lente, des aiguilles lorsqu'elle est rapide.

La présence nécessaire d'eau pour obtenir l'acide cristallisé, la légère perte de poids (2 à 3 o/o) par dessiccation et chauffage à 80° ont fait conclure à HAMMARSTEN que l'acide taurocholique possède une molécule d'eau de cristallisation d'où la formule, selon cet auteur :



II. Bile de chien. Saponification spontanée du taurocholate.

— Nous venons d'analyser les différentes méthodes de préparation du sel biliaire soufré. Toutes sont basées sur des précipitations fractionnées de la bile nature, avec toutes ses impuretés, par des réactifs minéraux : acétate de plomb, chlorure ferrique, alun, chlorures alcalins.

Non satisfait des méthodes trop particulières de nos devanciers, nous avons cherché une technique plus générale complétant le mode de traitement de la bile exposé au chapitre premier.

Nous nous sommes adressés à la bile de chien, très riche en taurocholate.

Grâce à la grande obligeance de M. GROSPERRIN, surveillant du service sanitaire, nous avons pu disposer de grandes quantités de ce produit. Les chiens sacrifiés à la fourrière municipale étaient autopsiés uniquement pour l'extraction de la vésicule biliaire.

La bile de 1.100 animaux, recueillie dans ces conditions

a donné un volume de 9 litres 812, c'est-à-dire 8 cc. 92 par vésicule.

La récolte de cette énorme quantité de bile a duré trois mois.

Le produit de chaque jour était versé dans un flacon de cinq litres contenant 150 centimètres cubes de chloroforme pour empêcher la putréfaction. On procédait chaque fois à une vive agitation pour bien saturer le liquide de chloroforme.

La bile recueillie en février, mars et avril 1903, a été conservée dans un endroit frais jusqu'en 1907. Elle ne présentait aucune modification sensible au moment où nous nous en sommes servis ; sa coloration seule avait changé, passant du jaune-brun au vert foncé.

Nous avons appliqué au traitement de cette bile notre méthode générale comprenant la séparation des matières grasses, des mucines, des sels, des matières pigmentaires et l'isolement des sels biliaires.

On prend un litre de bile qu'on épuise avec de l'éther ; on évapore à sec au bain-marie puis à l'étuve à 40° et on reprend par de l'alcool méthylique fort. On constate alors que le résidu est beaucoup plus important qu'avec de la bile fraîche du même animal, et possède des caractères spéciaux. Au lieu d'être dur, compact, légèrement élastique, il est au contraire tendre, friable, très léger. Sa coloration est gris verdâtre et non brunâtre. Examiné attentivement il possède des reflets brillants.

Au microscope on aperçoit au milieu d'amas amorphes, de petites aiguilles prismatiques, les unes très minces, d'autres plus épaisses fortement aplaties sur deux faces latérales opposées et terminées par des sections obliques. Ces cristaux polarisent activement la lumière. Après de multiples essais de solubilisation, l'épuisement par l'eau nous a permis de les séparer.

Le résidu biliaire insoluble dans l'alcool méthylique est donc versé dans de l'eau distillée et chauffé quelques instants au bain-marie. On filtre la liqueur chaude, il passe un liquide

coloré en brun, répandant une odeur fade et sur filtre reste une matière amorphe, brun verdâtre de consistance caoutchouteuse.

Après concentration, il se dépose par refroidissement, de petits cristaux semblables aux aiguilles qui viennent d'être décrites; on le recueille sur trompe; une nouvelle évaporation donne encore une deuxième récolte de cristaux etc. jusqu'à épuisement. Dans les eaux-mères s'accumule une substance brune qui, par dessiccation, donne des croûtes pailletées d'une matière appartenant au groupe des mucines ou pseudo-mucines.

Le poids de matière cristallisée s'élève à 22 gr. pour un litre de bile.

Nous avons cherché à en déterminer la nature.

Soumise à la calcination, elle devient amorphe, blanchit et noircit sans fondre, puis brûle en charbonnant abondamment. Au début de la combustion on perçoit un faible dégagement d'anhydride sulfureux. Il ne reste aucune trace de cendres. Chauffée en présence de potasse solide elle dégage de l'ammoniac. Saveur légèrement salée.

Dosage de l'azote (méthode de KJELDHAL)

I. Matière = 0,5371.

Az = 0,0589

Az o/o = 10,97

II. Matière = 0,6524.

Az = 0,0717

Az o/o = 11

Dosage du soufre (méthode de CARIUS)

I. Matière = 0,432.

SO⁴Ba pèse = 0,786

S = 0,108

S o/o = 25,12

II. Matière = 0,3625.

SO⁴Ba pèse = 0,669

S = 0,092

S o/o = 25,46

Il, s'agit donc bien de taurine existant à l'état libre dans la bile ainsi conservée.

Il nous restait à rechercher l'origine de cette taurine ? Plusieurs hypothèses se présentaient à l'esprit, seul le contrôle expérimental pouvait fixer la valeur de chacune.

C'était d'abord la présence à l'état normal de taurine libre dans la bile de chien. Mais les expériences faites précédemment avaient démontré que la bile fraîche n'en renferme pas. Puis la possibilité d'une saponification des taurocholates pendant l'évaporation de la bile au bain-marie. Certains auteurs admettant que cette simple concentration à chaud provoque la libération de taurine. Nous avons fait de nombreux essais non seulement avec de la bile de chien, mais avec d'autres biles riches en sels soufrés (bœuf, veau, congre). Dans tous les cas, les résultats ont été négatifs ; nous avons même constaté que l'ébullition prolongée de la bile maintenue à un volume à peu près constant ne provoque aucune modification hydrolytique sensible.

La coïncidence entre ces deux faits : présence de taurine et durée de conservation de la bile nous conduisaient à rechercher une relation étroite, de cause à effet, entre ces deux facteurs. Nous avons consacré à cette étude trois échantillons de bile : 1^o un litre de bile de chien datant de 11 mois ; 2^o 200 cc. de bile de bœuf remontant à 7 mois ; 3^o deux litres de bile de congre de 18 mois ; tous échantillons additionnés de CHCl_3 , déposés dans des chambres froides au-dessous de 10° et sans fermentation apparente. Or il nous a été impossible dans aucun des trois de retrouver de taurine libre. Bien que très inférieur à celui de la bile de chien (4 ans), le temps de conservation était suffisamment important pour qu'il ait au moins un début de saponification.

Enfin on pouvait invoquer les phénomènes de fermentation si fréquents dans la bile de la plupart des animaux. Les recherches de BUCKNER sur la bile putréfiée avaient, en effet, démontré que la putréfaction peut libérer de la taurine en même temps d'ailleurs que de l'ammoniac dans des biles soufrées. Nous avons donc étudié au point de vue bactériologique cette bile suspecte.

. Comme nous l'avons dit, l'examen macroscopique nous avait montré que sauf la coloration devenue verdâtre, ses caractères physiques étaient restés les mêmes : odeur fade caractéristique, limpidité, absence de grumeaux ou de voiles microbiens. Or lorsqu'une bile fermente très vite elle dégage une forte odeur sulfurée ou ammoniacale, sa coloration vire au rouge, puis s'atténue fortement, enfin on constate la présence de troubles ou de voiles bactériens.

. Nous ferons remarquer, à ce sujet, que si les biles de bœuf, veau, porc, etc., putréfient facilement, celle de chien fermente avec beaucoup plus de difficulté.

De nombreux examens bactériologiques ont été faits sur des échantillons de bile pris à des hauteurs différentes. Les diverses méthodes de coloration simple ou double : thionine, ziehl dilué, gram, etc., n'ont rien donné.

. Pris dans les mêmes échantillons, de nombreux ensemencements sur les milieux ordinaires, bouillon simple et peptoné, gélose, gélatine, pomme de terre, sont restés stériles aussi bien dans le vide qu'à la pression ordinaire.

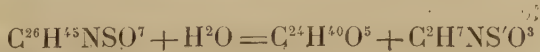
. Nous étions ainsi conduits à attribuer la saponification partielle des sels soufrés de la bile à la présence du chloroforme employé à titre d'antiseptique. Comment expliquer l'action du chloroforme ?

. Nous admettrons qu'il se décompose lentement avec mise en liberté d'acide chlorhydrique ; et nous verrons plus loin combien est active cette influence hydrolisante des acides minéraux même à des teneurs très faibles sur le taurocholate.

. Or précisément le chloroforme avait presque totalement disparu dans cette bile ancienne. C'est là un argument sérieux à l'appui de l'hypothèse de sa décomposition progressive.

Que devient l'acide cholalique correspondant aux 22 gr. de taurine ?

Si l'on admet l'équation classique :



on trouve que théoriquement 408 grammes d'acide cholalique correspondent à 107 grammes de taurine, et dans ce cas particulier que 22 grammes de taurine valent 83,98, c'est-à-dire 84 grammes d'acide cholalique.

Ces 84 grammes de substance ne sont cependant pas précipités comme ils devraient l'être et comme cela a lieu dans le cas de l'hydrolise acide.

Faut-il admettre que dans la bile, milieu éminemment colloïdal, la chaîne cholalique libérée reste à l'état de dissolution plus ou moins parfaite, de même qu'une série d'autres matières, graisses, acides gras, lécithines, cholestérines, etc. ; ou bien entre-t-il en combinaison avec le taurocholate non attaqué pour faire un sel acide ?

La question reste entière.

Si, pour nous, l'existence de taurine libre dans la bile de chien conservée en présence de chloroforme est due à l'action de ce composé chloré, il semble que cette action ne doive pas être étendue à d'autres biles. La bile de congre, par exemple, après deux ans de conservation dans les mêmes conditions, n'a subi aucune modification. Malgré les recherches les plus minutieuses nous n'avons pu constater la présence de taurine dans un volume de 1 litre 850 de liquide.

La différence des résultats ne peut s'expliquer par la seule question de temps ; il faut certainement faire intervenir les propriétés particulières des taurocholates des deux espèces animales d'ailleurs si éloignées dans l'échelle zoologique.

III. — **Taurocholate de soude cristallisé.** — *Méthode de préparation.* — Nous partons de la masse des acides biliaires obtenus en traitant la bile de chien conservée en présence de CHCl_3 d'après notre méthode de traitement général de la bile. On les dissout dans l'eau et on traite par la baryte pour précipiter les petites quantités de glycocholate. Après carbonatation et filtration, on concentre les eaux qui contiennent le taurocholate.

C'est dans une de ces concentrations restée incomplète

que nous avons eu précisément l'occasion de constater la grande facilité de cristallisation du sel soufré de la bile de chien.

Le produit du traitement d'un litre de bile, en vue de séparer le taurocholate, avait été évaporé au bain-marie à consistance sirupeuse, puis abandonné plusieurs mois dans un endroit sec. En reprenant cette matière nous avons remarqué qu'il existait des centres de cristallisation dans la masse et qu'en traçant avec une baguette de verre des lignes reliant ces centres, la cristallisation se propageait en quelques instants suivant ces directions. Bientôt toute la masse fut envahie.

Les cristaux examinés au microscope étaient de gros prismes allongés, polarisant fortement la lumière, mais dont le système cristallin n'a pu être déterminé. Vainement nous avons tenté de les isoler de leur gangue amorphe blonde. L'eau distillée froide dissout très vite à la fois les cristaux et la substance amorphe.

L'alcool aqueux en fait autant. L'alcool absolu dissout d'abord la matière amorphe et les petits cristaux ; les gros cristaux, au contraire, persistent un certain temps ; on aurait donc pu en séparer sur trompe une bonne partie. Mais préoccupés d'appliquer la méthode classique de cristallisation dans le milieu éthéro-alcoolique de PLATTNER, nous avons négligé de les recueillir. Nous nous proposons d'ailleurs de revenir sur ce point intéressant, qui n'a été signalé par aucun auteur.

Pour le moment, nous retiendrons seulement ce fait, c'est qu'il est possible d'obtenir à l'état cristallisé, le taurocholate de la bile du chien par simple concentration du sel amorphe tel qu'on l'isole d'après notre technique. La cristallisation rappelle celle des sucres dans les sirops concentrés ; la sursaturation souvent très longue peut être rompue par l'addition d'un germe ou par toute autre cause mécanique. L'isolement des cristaux de sel biliaire, bien que délicate, n'est pas impossible ; le sirop cristallin versé sur filtre à succion et traité par de petites quantités d'alcool absolu libère, en effet, les gros cristaux.

Nous avons préparé le taurocholate cristallisé en saturant

une trop grande concentration en éther sont repris par l'alcool absolu et peuvent ainsi rester dans le cycle des cristallisations ménagées.

Les cristaux une fois formés, il reste à les isoler et à les conserver. La difficulté à surmonter est ici très grande. Si on essaie de les recueillir sur filtre de papier même en opérant à basse température et en s'aidant du vide, il arrive que la filtration est trop lente et qu'ils se redissolvent presque en totalité dans leurs liqueurs mères. C'est, qu'en effet, les liqueurs abandonnent, par évaporation, pendant cette opération d'une certaine durée, en même temps que les cristaux, de petites quantités de sel biliaire amorphe. Or celui-ci est très hygroscopique; dans un air non sec il absorbe très rapidement de la vapeur d'eau, fond et redissout les éléments cristallins.

Nous avons, après bien des insuccès, résolu la difficulté, par l'emploi de filtres système Garos. Ce sont des cônes de dimensions variables, en terre spéciale d'une grande porosité. Pour utiliser ces cônes, on les dispose dans des entonnoirs en verre sur les parois desquels ils s'appuient grâce à des anneaux en caoutchouc, ou pessaires. Ils sont montés sur des récipients coniques reliés à une trompe à eau à grand débit. Sous l'influence du vide, la garos s'appuie avec force sur le pessaire.

On verse alors sur ces filtres ainsi disposés les solutions mères contenant les cristaux biliaires. La liqueur éthéro-alcoolique filtre instantanément, laissant ses cristaux qui se déposent et se dessèchent presque complètement.

On les recueille avec soin en évitant les souillures assez fréquentes dues à la friabilité des cônes. A l'aide d'un scalpel on les détache et on les soumet à l'action du vide sur acide sulfurique. Nous avons préparé, par cette technique 80 grammes d'un très beau produit blanc, stable à l'air sec.

Au point de vue rendement, on peut dire que toute le taurocholate amorphe est susceptible de prendre la forme cristalline. Les déchets sont dus à des pertes pendant les manipulations toujours délicates.

HAMMARSTEN, dans ses recherches sur la bile de petite morue, attribue la non-cristallisation d'une importante quantité de sel biliaire à l'emploi d'alcool concentré. Nous avons essayé, comme il le conseille, d'employer des alcools aqueux ; mais sans succès. On obtient plus difficilement des cristaux et au-dessous de 15 o/o d'eau plus rien ne cristallise.

L'alcool éthylique n'est pas le seul alcool au sein duquel le taurocholate peut cristalliser.

L'alcool amylique, en particulier, nous a donné de bons résultats. On dissout le sel biliaire amorphe dans un assez grand volume d'alcool amylique sec et on ajoute lentement de l'éther. Il se fait ici également un léger trouble à chaque addition ; ce trouble persiste lorsqu'on a atteint une certaine limite que l'on apprécie avec un peu d'habitude. Après quelques instants il se forme des prismes allongés très peu épais, brillants, qui se séparent par filtration sur garos. Après évaporation de l'éther, les cristaux se redissolvent très vite dans leurs liqueurs-mères amyliques. Ils doivent donc être recueillis aussitôt formés. On peut isoler plusieurs récoltes de cristaux.

Même en l'absence d'éther, le taurocholate est susceptible de cristalliser ; la lente évaporation d'une solution de sel biliaire dans l'alcool éthylique absolu donne de gros prismes, souvent légèrement jaunes, groupés en houppes ou en étoiles.

La recristallisation du taurocholate de soude n'offre pas d'autres difficultés que celles de la première cristallisation. Les cristaux sont dissous dans l'alcool éthylique absolu à une dilution étendue ; on ajoute de l'éther jusqu'à louche persistant.

Cette opération correspond, bien entendu, à une purification ; on obtient de très longues aiguilles blanches, brillantes, soyeuses ; mais en même temps elle s'accompagne de pertes importantes. Partant de 10 grammes de matières, on en récupère à peine 4 grammes ; le reste demeure en sursaturation.

1. *Propriétés physiques.* — Le taurocholate cristallisé de la bile de chien se présente donc sous l'aspect de fines aiguilles, incolores, agissant énergiquement sur la lumière polarisée.

Ces cristaux sont très stables à l'air sec ; dans l'air plus ou moins saturé de vapeur d'eau, ils l'absorbent peu à peu, se ramollissent et se résolvent en une masse sirupeuse blonde.

Leur stabilité est d'autant plus grande qu'ils sont plus purs ; nous avons conservé les échantillons de deuxième cristallisation pendant plus de vingt jours dans l'atmosphère du laboratoire.

Comme nous l'avons déjà dit, la présence entre les cristaux, de traces de sel amorphe entraîné pendant la cristallisation ou formées au cours de la filtration explique leur instabilité.

Le taurocholate ne possède aucune odeur spéciale, sauf une légère odeur fade. La saveur en est très particulière ; une parcelle infiniment petite déposée sur la pointe de la langue provoque une sensation douce et fortement sucrée. Puis dès que la salive est parvenue à la base de l'organe et dans le pharynx, on perçoit une saveur fade et écœurante qui détermine des nausées.

Nous n'avons pu constater l'amertume si accusée dont parle les auteurs et sur laquelle HAMMARSTEN s'est appuyé pour admettre l'existence des deux acides biliaires soufrés : *acide taurocholique* et *acide taurocholénique*.

La solubilité du taurocholate, nulle dans l'éther, est assez élevée dans l'alcool froid et surtout chaud, et très grande dans l'eau.

Il fond à 250° au bloc MACQUENNE, en se ramollissant.

Pouvoir rotatoire spécifique est $\alpha_D = 27^{\circ}5'$ en solution alcool éthylique à la température moyenne de 20°.

2. *Propriétés chimiques.* — Le taurocholate cristallisé, après dessiccation à poids constant sous vide sulfurique est soumis à l'analyse élémentaire.

Combustion

I. Matière = 0,2958	{	Acide carbonique = 0,6560
		Eau = 0,2279
II. Matière = 0,4012	{	Acide carbonique = 0,8906
		Eau = 0,3163

Dosage de l'azote (méthode de KJELDAHL)

I. Matière = 0,7508	Az = 0,01457	Az o/o = 1,94
II. Matière = 0,7340	Az = 0,01499	Az o/o = 2,04

Dosage du soufre (méthode de CARIUS)

I. Matière = 0,6227	SO ⁴ Ba pesé = 0,1035	$\left\{ \begin{array}{l} S = 0,01422 \\ S' \text{ o/o} = 2,283 \end{array} \right.$
II. Matière = 0,4979	SO ⁴ Ba pesé = 0,0828	$\left\{ \begin{array}{l} S = 0,01137 \\ S' \text{ o/o} = 2,284 \end{array} \right.$

Dosage du sodium

La matière est brûlée en capsule de platine et les cendres reprises par H²O sont titrées à l'aide de liqueur sulfurique décime en présence d'hélianthine.

I. Matière = 1,6185 donnent 0,03576 de Na, et o/o = 2,21

II. Matière = 2,5321 donnent 0,0536 de Na, et o/o = 2,12

Si on réduit ces résultats numériques en centièmes pour l'acide taurocholique, on obtient, toutes corrections faites :

Calculé pour C ⁶⁴ H ¹⁰⁸ N ² SO ¹⁶	
C = 64,1	C = 63,56
H = 9	H = 8,90
N = 2,1	N = 2,32
S = 2,35	S = 2,51
O = 22,35	O = 21,25

La comparaison de ces résultats analytiques avec les chiffres classiques pour l'acide taurocholique (C²⁶H⁴³NSO⁷) montre que la proportion de S et d'azote est notablement inférieure dans notre produit, environ d'un tiers ; la teneur en taurine est donc diminuée dans le même rapport.

Il s'agit bien cependant d'un taurocholate, puisqu'il possède la racine cholalique, mais d'un taurocholate plus riche en ce noyau fondamental des acides biliaires. Si l'on considère la taurine comme une base par rapport au groupe cholalique, on est en présence d'un sel analogue aux sels acides de la chimie.

Sans faire d'hypothèse, nous nous contenterons de fixer par un nom la place de ce composé dans la nomenclature physiologique et nous l'appellerons β . *taurocholate*.

Bien qu'obtenu dans des conditions un peu spéciales, il n'est pas douteux qu'on puisse le préparer systématiquement par action lente et calculée des acides minéraux HCl , SO^4H^2 sur le taurocholate amorphe isolé facilement par notre méthode de la bile fraîche, c'est-à-dire non modifiée, de chien.

De même, on conçoit la possibilité d'obtenir d'autres taurocholates à molécule plus ou moins riche en groupe cholalique.

C'est, à notre avis, un exemple très intéressant des combinaisons complexes auxquelles les substances organiques peuvent se prêter *in vitro* et très probablement de même *in vivo*.

Hydrolyse acide du β taurocholate de soude cristallisé.

L'hydrolyse est faite en liqueur sulfurique.

1. On dissout 10,95 de sel biliaire dans 500 centimètres cubes d'eau.

La solution est chauffée au bain d'huile à l'ébullition (130 à 135°).

L'acide sulfurique (28 gr. SO^4H^2 pur) étendu à 150 cc. est ajouté en quatre fois ; l'hydrolyse se fait ainsi progressivement et l'acide cholalique précipite par petits paquets.

Au début la liqueur mousse abondamment, puis l'ébullition devient régulière.

Après 7 heures de chauffage on décante les eaux.

On recueille l'acide cholalique sous l'aspect d'une matière blonde, molle et plastique à chaud, dure et friable à froid. Après lavage et dessiccation, il pèse 7 gr. 72.

Les eaux, avant traitement par le baryte, sont épuisées à froid par l'éther. Ce solvant enlève dans ces conditions une très-petite quantité d'un produit huileux brun, à odeur résineuse, soluble dans les alcools et qui ne cristallise pas. Le poids de cet extrait est d'environ 0,05 à 0,08.

La concentration des jus d'hydrolyse légèrement sulfuriques permettent d'isoler après élimination des sels minéraux, la taurine cristallisée $P = 0,29$.

Le rendement s'élève donc ici à 2,7 o/o seulement.

2. On part de 9,840 de sel cristallisé.

On dissout dans 250 centimètres cubes d'eau, puis on ajoute pendant l'ébullition et peu à peu, 6 grammes de SO^4H^2 pur étendu de 50 centimètres cubes d'eau.

A chaque addition il se fait un très léger trouble blanchâtre.

Au bout d'une heure l'hydrolyse commence; à la surface du liquide monte des trainées huileuses blondes d'acide cholalique. L'attaque est continuée pendant 14 heures.

On sépare alors l'acide cholalique qui, sec, pèse 6,96.

Les eaux débarrassées d'acide sulfurique donnent par concentration, 0 gr. 25 de taurine cristallisée, c'est-à-dire 2,52 o/o.

Le rendement moyen de taurine est donc de 2,6 pour 100 grammes de β taurocholate de soude cristallisé.

IV. Recherches biologiques sur le β taurocholate de soude cristallisée. — Comme pour le glycocholate, nous avons étudié l'action du taurocholate sur les globules sanguins et sa toxicité pour l'organisme.

1. *Toxicité.* — Recherches faites en collaboration avec M. Guillaume LÉVÊQUE.

Elles ont porté sur les animaux de laboratoire, cobayes, chiens et sur quelques types inférieurs appartenant aux genres *lymnea*, *planorbis*, *nephelis*, *glossiphonia*.

1. *Cobayes.* — On utilise des solutions à 10 o/o. Les injections sont faites à la seringue, sous la peau ou en péritoine.

Injectons hypodermiques. — 3 novembre. Cobaye n° 1 (poids=370), reçoit 2 cm³ 5 sous la peau de la cuisse droite. L'animal meurt en 16 heures.

Autopsie : Légères lésions hémorragiques au point d'inoculation ; dans la cavité abdominale, faible quantité de sérosité rosée, congestion des organes viscéraux, en particulier de l'intestin grêle; urine normale.

Cobaye n° 2 (poids=390), on injecte 2 centimètres cubes en arrière de l'épaule gauche.

Le 4, sujet est triste, se cache dans sa cage ; œdème au niveau de l'injection.

Le 5, mêmes symptômes généraux, poids hérissés, anorexie complète.

Le 6 et 7, amélioration sensible, l'œdème évolue vers l'induration fibreuse.

Cobaye n° 3 (poids=410), injection de 2 cm³ 5 sous la cuisse droite, même réaction générale, moins alarmante, guérison rapide.

Cobaye n° 4 (poids=255), reçoit seulement 2 centimètres cubes à cause de sa petite taille.

Le 4 et 5, affaiblissement général, œdème très douloureux, perte d'appétit.

Le 6, il est trouvé mort.

Autopsie : Au niveau de l'œdème, infiltration abondante gélatineuse du tissu conjonctif, sérosité jaune citrin.

Absence de lésions viscérales et de sérosité intra-péritonéale, urine normale.

Cobaye n° 5 (poids=300), injection de 2 cm³ 5 dans la cuisse gauche, faibles accidents locaux, guérison en 3 jours.

Cobaye n° 6 (poids=280), reçoit 1 cm³ 5 sous l'abdomen, œdème peu étendu, guérison.

Cobaye n° 7 (poids=468), reçoit 7 centimètres cubes : 4 centimètres cubes cuisse gauche, 3 centimètres cubes cuisse droite.

Le 4, grande prostration, abdomen dur, tendu, douloureux, anorexie totale, mort le 5.

Autopsie : Infiltration œdémateuse dans toute la région abdominale, rien d'anormal dans le péritoine et l'urine.

Cobaye n° 8 (poids=450), injection de 3 centimètres cubes sous la peau du dos, œdème peu accusé, guérison rapide.

Cobaye n° 9 (poids=384), reçoit 5 centimètres cubes en arrière des deux épaules, 24 heures après il succombe avec une infiltration post-scapulaire assez abondante.

Cobaye n° 10 (poids=480). On injecte 6 centimètres cubes, 3 centimètres cubes sous chaque cuisse.

Le 4, état général très mauvais, frissons, poils hérissés, yeux larmoyants, mort le 5 au matin.

Autopsie : Œdème abondant s'étendant à tout l'abdomen, sérosité légèrement jaunâtre.

Dans le péritoine aucune exsudation, intestin et foie congestionnés.

Le contenu de la vésicule biliaire est ici légèrement coloré en rose, faisant supposer la présence de pigment sanguin dans la bile.

Nous avons, en effet, constaté à l'examen spectroscopique et réperé les trois bandes de l'hémoglobine $\lambda = 634$, $\lambda = 675$, $\lambda = 535$.

C'est le seul cas où nous avons observé ce phénomène intéressant d'élimination de matière colorante du sang par le foie et la bile.

Si l'on calcule en se basant sur ces expériences, la toxicité du taurocholate ; on trouve que pour tuer un cobaye du poids moyen de 39a gr. il faut employer 4 cm³ 5 de la solution à 10 % de sel biliaire, c'est-à-dire 0 gr. 45 de sel sec.

La dose toxique est donc de 0 gr. 115 pour 100 gr. de cobaye. Les lésions relevées sur le cadavre sont de nature congestives, et toujours faibles. La mort est donc le résultat d'une intoxication générale.

Injections intra-péritonéales. — Une série de 8 cobayes ont été inoculés par cette voie.

12 novembre. Cobaye n° 1 (poids=295) infection de 1 cm³ 5.

Les jours suivants douleurs vives au milieu de l'abdomen, puis tout rentre dans la normale sans accident local.

Cobaye n° 2 (poids=370), reçoit 2 centimètres cubes.

Symptômes généraux graves, immobilité, frissons, anorexie complète ; la mort survient en moins de 24 heures.

Autopsie : Sérosité rosée dans le péritoine, congestion du grand épiploon, du mésentère, et de l'intestin grêle.

Cobaye n° 3 (poids=350), injection de 2 centimètres cubes.

Douleurs abdominales, le sujet se déplace avec difficulté en écartant les membres postérieurs, dès le 3^e jour il se produit une amélioration sensible, guérison.

Cobaye n° 4 (poids=269), injection de 3 centimètres cubes, mort en 15 heures.

Autopsie : Lésions congestives uniquement localisées sur l'intestin grêle.

Cobaye n° 5 (poids=558) reçoit 4 centimètres cubes, mort en 24 heures.

Autopsie : Mêmes lésions avec en outre de la sérosité rosée dans le péritoine.

Cobaye n° 6 (poids=207), injection de 2 centimètres cubes, mort dans le coma en 13 heures.

Autopsie : Congestion intestinale, sérosité rosée.

Cobaye n° 7 (poids=850) injection de 5 centimètres cubes, mort en 24 heures, abdomen très ballonné.

Autopsie : Mêmes lésions, légère infiltration des parois abdominales.

Par la voie intra-péritonéale, pour tuer un cobaye du poids moyen de 44 gr. il faut injecter seulement 3 cm³ 2 d'une solution à 10 o/o de taurocholate, c'est-à-dire 0,32 de sel sec.

La dose toxique est donc de 0,071 pour 100 gr. de cobaye.

2. Chien. — Nous avons administré le sel biliaire d'abord par la *voie digestive*.

Sujet n° 1 (poids=5,700). A l'aide de la sonde on introduit dans l'estomac vide, 30 centimètres cubes de solution à 10 o/o.

Aussitôt après on observe de l'inquiétude, puis des nausées, des efforts de vomissements dont un s'accompagne du rejet d'un liquide légèrement jaunâtre. Tout cesse et l'animal consomme son repas avec appétit.

Sujet n° 2 (poids=6,500). On verse 35 centimètres cubes par la sonde, mêmes phénomènes, anxiété, nausées, vomissement incomplet arrêté par une déglutition rapide. Absence de diarrhée ou de tout autre trouble intestinal.

Comme l'avait déjà démontré M. le Professeur Dastre pour la bile nature, le tube digestif jouit d'une grande tolérance vis-à-vis des sels biliaires soufrés.

Injectations hypodermiques. — Solution à 10 o/o.

6 octobre. Sujet n° 3 (poids=7,400). On injecte 6 centimètres cubes dans le flanc droit et 10 centimètres cubes à gauche.

Le 7, aux deux points d'inoculation présence de tuméfactions œdémateuses, chaudes, sensibles ; l'animal est très abattu ; il se tient le dos voussé, les conjonctives injectées, de fréquents tremblements le secouent.

Circulation et respiration très accélérées, température = $40^{\circ}7$.

On fait deux nouvelles injections de 5 centimètres cubes en arrière de chaque épaule.

Le 8, même état, plus alarmant encore, température = 41° ; le malade maigrit, appétit très diminué ; seule la viande est consommée et en petite quantité.

Dans la soirée, on observe des vomissements fréquents avec expulsion de mucosités jaunâtres ; en même temps apparaît une diarrhée, peu abondante ; fèces noirâtres, striées de mucosités et répandant une odeur fade, écœurante.

Le 9, amélioration de l'état général, mouvements respiratoires moins nombreux ; pouls légèrement accéléré, température = $39,8$.

A deux heures, température = $40^{\circ}3$. On injecte à nouveau 16 centimètres cubes en deux fois, en avant de chaque épaule.

Le 10 aggravation très sensible, les vomissements ont repris plus nombreux, la matière rejetée est un liquide visqueux, mais incolore. L'animal est triste, abattu et reste couché, suppression de l'appétit ; température = $40^{\circ}8$.

Tous les points d'inoculation sont fortement engorgés ; au niveau des premiers (flancs droit et gauche) foyers d'abcédation.

Le 11, vomissements ; diarrhée profuse, verdâtre, d'odeur infecte, urine foncée, rougeâtre mais sans pigments d'origine hématiche.

Le 12, l'animal est sacrifié ; il a maigri d'une façon effrayante (poids = 5.200).

Autopsie : Chaque œdème dû aux injections constitue un foyer purulent ; les premiers en date sont plus près de leur maturité que les derniers dont le centre est à peine ramolli : Le pus est liquide, crémeux, sans fragments de tissus nécrosés, c'est un pus de bonne nature.

L'étude bactériologique démontre qu'il s'agit d'abcès extrêmement pauvres en agents microbiens ; on trouve une seule bactérie très courbe, à bouts arrondis et colorable par la méthode de Gram, absence de pyogènes.

Rien d'anormal dans la cavité thoracique.

Aucune exsudation intra-péritonéale ; intestin vide d'aliments, ne contenant qu'une petite quantité de mucosités jaunâtres.

Le foie seul présente des lésions : notable hypertrophie (poids 1,050), tissu lavé, friable, de coloration feuille morte.

Vésicule biliaire gonflée contenant 28 centimètres cubes de bile orangée, sans pigment sanguin.

10 octobre. Sujet n° 4 (poids = 6.000), solution à 5 o/o.

On injecte 5 centimètres cubes dans chaque flanc, la température s'élève le soir même à $39^{\circ}7$.

Le 11, température 40° , l'animal est triste et mange à peine.

On injecte 10 centimètres cubes en arrière de l'épaule droite.

Le 12, température = $40^{\circ}2$, œdèmes au niveau des points d'inoculation, douloureux, mais peu volumineux.

Nouvelle injection de 10 centimètres cubes sur le côté droit du thorax et de 16 centimètres cubes en arrière de l'épaule gauche.

Le 13, température = $40^{\circ}4$, forte aggravation, tristesse augmentée, anorexie complète ; fréquentes nausées. Urine normale.

L'exploration des œdèmes montre que les uns ont évolué vers la sclérose conjonctive (ce sont ceux qui se sont produits sous l'influence des faibles volumes de solution biliaire, 5 centimètres cubes, les autres vers la suppuration (injection de 10, 16 centimètres cubes).

En réalité ce n'est pas le volume qui a de l'importance c'est avant tout le poids de substance injectée.

Tant qu'on ne dépasse pas 0 gr. 25 de sel biliaire sec quelle que soit la dilution, il se produit sans doute un œdème, mais qui guérit et se termine par un foyer de sclérose.

Au contraire au-dessus de cette concentration l'œdème aboutit toujours à la suppuration.

Le 14, mêmes symptômes généraux, douleurs très vives, frissons, cependant pas de vomissements, nausées peu nombreuses, température = $40^{\circ}2$.

Le 15, légère amélioration, température = $39^{\circ}7$; l'œdème en arrière de l'épaule gauche s'est ouvert donnant écoulement à du pus crémeux.

Le 16, on sacrifie le sujet qui a refusé toute nourriture depuis 2 jours.

Autopsie : Parmi les lésions sous-cutanées provoquées par les injections de taurocholates, les unes sont devenues des noyaux d'induration fibreuse, les autres des foyers de fonte purulente. Pus louable, sans îlots de nécrose, très pauvre en bactéries. Par l'examen et les cultures on constate la présence de staphylocoques.

Les organes des grandes cavités thoraciques et abdominales sont indemnes ; bile, urine, de coloration normale.

Ce qui frappe le plus c'est en somme l'état de cachexie avancée dans lequel se trouve le cadavre.

Le 16 octobre. Sujet n° 5, jeune chien (poids = 8.400), très robuste, reçoit 5 centimètres cubes dans le flanc gauche.

Le 17, œdème peu volumineux, mais chaud et sensible ; on injecte 12 centimètres cubes dans le flanc droit.

Le 18, température = $39^{\circ}5$, léger abattement, diminution de l'appétit, fortes souffrances dans le flanc droit. On injecte 10 centimètres cubes en arrière de l'épaule gauche.

Le 19, température = $40^{\circ}1$, frissons nombreux, anorexie.

Le 20, l'œdème du flanc droit s'est abcédé largement, pus peu riche en bactéries, rares staphylocoques, température = $39^{\circ}8$.

Le 21 et 22, l'état général est devenu très inquiétant ; prostration complète, affaiblissement considérable. La maladie du jeune âge s'est déclarée sous la forme d'inflammation catarrhale de toutes les muqueuses digestives et respiratoires.

On sacrifie le sujet pour éviter d'inutiles souffrances.

Autopsie : Abscès du flanc droit en période de bourgeonnement cicatriciel, engorgement post-scapulaire en voie de suppuration centrale.

Sérosité rougeâtre dans le péritoine.

Desquamation épithéliale abondante au niveau de la muqueuse intestinale avec mucosités jaunâtres.

Tels sont les résultats observés à la suite d'injections de β taurocholate de soude chez le chien.

Ce sont, d'une part, des phénomènes dus à l'absorption du sel biliaire et à son élimination par les voies digestives ; et d'autre part des réactions locales avec répercussion générale.

Les premiers se traduisent par des troubles digestifs : baillements, nausées chez tous les sujets, vomissements chez quelques-uns avec expulsion de mucosités, jaunâtres, d'odeur fade, souillées de produits biliaires, enfin diarrhée à tous les degrés. Ils sont dus à un passage du sel biliaire dans la circulation générale et à son élimination au moins partielle au niveau du tube digestif.

Les secondes sont des suppurations plus ou moins diffuses causées par une irritation produite sur place par la matière injectée, ou plutôt par une non adsorption totale de cette même matière qui injectée en trop grande quantité devient corps étranger et doit être éliminée par le procédé ordinaire de la suppuration. Les phénomènes généraux, élévation de la température, trouble des grandes fonctions, sont une conséquence de celle-ci.

Nous venons de voir que la question « poids de matière » joue un rôle considérable dans la formation des foyers de suppuration et des troubles généraux graves qui en résultent. En effet, au-dessous de 0 gr. 25 par injection il y a absorption totale et pas d'abcès.

Il nous a semblé que le problème devait avoir une solution plus générale et qu'il fallait très certainement mettre en cause la constitution moléculaire elle-même de la substance étudiée.

Nous avons cherché dans cette voie et nous avons choisi des composés chimiques voisins des sels biliaires.

Les sels alcalins des acides gras élevés, c'est-à-dire les savons, nous ont paru très favorables à ces études. Ces substances ont, d'ailleurs, au point de vue chimique et physique, de grandes analogies avec ces derniers, nous l'avons déjà montré plus haut.

Nous avons d'abord utilisé le stéarate de soude.

On en fait une solution à 5 % dans de l'eau distillée. La liqueur est neutralisée avec soin, en présence de tournesol, par de l'acide acétique étendu ; il se fait un trouble très léger. On injecte tiède.

18 novembre. Un chien de 5 kilos reçoit 10 centimètres cubes de cette solution en arrière de l'épaule gauche et 5 dans le flanc droit.

Le 19, l'animal est triste, abattu et se ment avec difficulté ; à gauche volumineux œdème, sensible au point d'inoculation ; à droite œdème plus modéré, mais douloureux aussi, température = 39°9.

Le 20, température = 40, l'œdème de gauche est abcédé, large lambeau de peau sphacelée, pus liquide pauvre en éléments figurés.

Celui de droite est ramolli au centre, mais encore fermé : on y puise aussi vite que possible du pus avec lequel on fait des frottis pour la recherche

des bactéries et des cultures sur les différents milieux. Absence d'éléments microbiens par les deux méthodes.

Le 21 on sacrifie l'animal qui a beaucoup maigri, aucune lésion en dehors des désordres locaux.

Le 22, on injecte la même solution à deux cobayes.

L'un reçoit 6 centimètres cubes sous la peau des cuisses et l'autre 5 centimètres cubes en péritoine.

Le 23, le premier sujet présente un volumineux œdème sous-ventral qui s'obscure avec nécrose de la peau le 24, suppure abondamment puis se cicatrice les jours suivants.

Le second succombe en 48 heures à une péritonie fibrineuse. Dans les fausses membranes présence d'une strepto-bacille prenant le gram.

Nous avons refait ces expériences avec les savons alcalins, des acides oléiques et lauriques purs.

Déjà, nous avons obtenu au point de vue absorption et formation d'abcès aseptiques, des résultats tout à fait identiques que nous poursuivons en ce moment.

Les sels biliaires, en particulier les taurocholates possèdent donc, en dehors de leurs pouvoirs toxiques vis-à-vis des hématies et de l'organisme tout entier, la propriété d'être difficilement absorbables à partir d'une certaine concentration tout comme les savons des acides gras élevés, propriété qu'ils doivent à leur constitution moléculaire.

3. *Animaux inférieurs.* — Dans des solutions aqueuses contenant des poids connus de taurocholate on dépose un certain nombre de ces animaux et on observe comment ils se comportent dans ce milieu.

18 août. α. — A 500 centimètres cubes d'eau ordinaire, on ajoute 4 centimètres cubes d'une solution à 10 o/o de sel biliaire (solution à 0,8 o/oo). La liqueur reste clair malgré la présence de chaux, les taurocholates alcalino terreux sont, en effet, solubles.

Dans le milieu on place

- 2 planorbes (*planorbis cornua*).
- 2 planorbes (*ombilicata*).
- 3 lymnées (*lymnea palustris*).
- 2 néphélis.

Le 19 et le 20, on note une simple diminution d'activité ; une des lymnées se fixe sur les parois du vase et reste immobile.

Le 21, elle est entourée d'une épaisse couche de mucus blanc qui forme bouchon à son orifice, sensibilité très atténuée.

Le 22, toute sensibilité à disparu et la putréfaction a déjà commencé.

Les autres ont repris leur activité normale.

β. — A 1.000 centimètres cubes d'eau on mêle 16 centimètres cubes de solution de taurocholate à 10 o/o (liqueur à 1,6 o/oo de sel biliaire).

- 3 planorbes (*planorbis cornua*).
- 3 planorbes (*planorbis umbilicata*).
- 1 lymnée (*lymnea palustris*).
- 4 lymnées (*L. limosa*).
- 1 paludine.
- 3 néphelis.
- 1 glossiphonie.

Au bout de trois jours, on constate la mort de 3 planorbes (3 planorbis umbilicata, 2 planorbis cornua) avec forte sécrétion de mucus, les autres restent un certain temps immobiles, puis elles reprennent leur activité et se débarrassent du mucus qui tombe au fond du liquide.

γ. — Solution à 2,5 o/oo de taurocholate.

- 6 lymnées $\left\{ \begin{array}{l} 4 \text{ (*L. limosa*)} \\ 2 \text{ (*L. palustris*)} \end{array} \right.$
- 2 sangsues (*hydrado officinalis*).
- 1 glossiphonie.

Dès le deuxième jour tous ont succombé sauf une sangsue de grosse taille qui résiste jusqu'au cinquième jour.

De ces quelques expériences il résulte que les taurocholates sont nettement toxiques pour ces êtres inférieurs puisqu'ils peuvent être tués déjà avec des concentrations de 0,8 pour 1.000.

Les mollusques manifestent leur sensibilité vis-à-vis de ces sels d'une façon inattendue par une forte sécrétion de mucus qui doit être considérée comme une réaction de défense.

Ces recherches, en dehors de leur intérêt théorique, peuvent dans une certaine mesure recevoir une application pratique en agronomie.

On sait, en effet, que les lymnées et les planorbes sont les hôtes nécessaires chez lesquels les embryons de doutes accomplissent leur passage à l'état de cercaires.

La destruction de ces mollusques par addition de bile dans les mares où elles vivent, permettrait d'atténuer dans une certaine proportion les progrès de ce fléau de l'élevage, qui constitue la distomatose du bœuf et surtout du mouton et qui est si répandue dans les régions basses et humides.

2. *Pouvoir hémolytique.* — Nous nous sommes servis d'hématies de cobaye, lavées plusieurs fois, sur lesquelles on fait agir une solution à 2 o/o de sel biliaire.

1^{re} série d'expériences. — On emploie 0 cm³ 2 de globules dilués dans 5 centimètres cubes de sérum physiologique.

Solution de taurocholate à 2 ‰

	Té- moin	Tubes + solution de sel biliaire									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Globules sanguins = 0 cm. ² .	. .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum physiologique = 5 cm ³ NaCl à 8,5 ‰	. .	0cc1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1 cm ³

4 heures, les mélanges de globules et de solutions biliaires sont mis à l'étuve à 38°.

4 h. 30, hématies partiellement déposées ; à partir de (IV), légère hémolyse, facile à apprécier seulement sur une zone superficielle de quelques millimètres, et qui est d'autant plus accusée qu'on se rapproche du dernier tube plus riche en taurocholate.

4 h. 35, après ces observations on remet à l'étuve.

5 h. 15, tube (X), hémolyse totale, liqueur limpide, rouge, stromas dissous ;

Tube (IX et VIII) hémolyse non encore achevée, solution troublée au microscope, présence de globules intacts et de stromas libres.

Tube (I et II), nulle.

Tubes intermédiaires, plus ou moins avancée, mais partielle.

5 h. 15, hémolyse totale dans VIII et IX.

6 h. 30, hémolyse totale dans VII, VI, V, début dans II.

7 h. 30, encore incomplète dans III et IV, nulle dans II.

Examinées au spectroscope les liqueurs laquées possèdent la bande $\lambda = 634$ que le fluorure de sodium fait transporter à $\lambda = 612$.

2^e série. — On expérimente sur un volume moindre de globules 0 cm³ 1.

Solution de taurocholate de soude à 2 ‰

	Témoin	Tubes + sel biliaire					
		I	II	III	IV	V	VI
Globules sanguins = 0 cm ¹		—	—	—	—	—	—
Sérum physiologique = 5 cm ³		2cc	3	4	5	6	7

4 heures, on dépose les tubes dans l'étuve.

4 h. 20, hématolyse partielle tubes I, II, totale dans les autres.

5 h. 20, hématolyse totale dans I, II.

On ajoute 0 cm³ 1 de globules dans tous les tubes et on remet à l'étuve (5 h. 15).

5 heures, hémolyse totale dans tous les tubes partielle dans I.

5 h. 15, hémolyse totale dans I.

On ajoute encore 0 cm³ 1 partout, étuve 5 h. 30.

6 h. 15, hémolyse totale, tubes (IV, V, VI, VII), très avancée III, débute dans II et I.

Addition de 0 cm³ 1 dans IV, V, VI et VII, étuve à 6-10.

6 h. 10, hémolyse totale dans VI et VII, très accentuée dans III, IV et V, partielle dans I et II.

6 h. 30, hémolyse totale dans tous les tubes.

Dernière addition de 0 cm³ 1 de globules, étuve à 6 h. 35.

7 heures, hémolyse partielle, mais de plus en plus accusée jusqu'à VII.

7 h. 20, hémolyse totale dans tous les tubes.

Ces expériences démontrent la grande toxicité hémolytique des taurocholates.

Pour fixer les idées, indiquons qu'il suffit de moins de 0 gr. 008 de sel biliaire pour dissoudre 0 cc. 2 de globules sanguins en 15 minutes.

Cette toxicité dépend d'ailleurs de plusieurs variables, temps de contact, température, dilution, etc.

Au point de vue de la pathologie générale c'est donc bien le taurocholate qui joue le rôle le plus important dans la destruction globulaire parfois si intense et si rapide qui complique les affections de l'organe hépatique.

CHAPITRE III

ACIDES CHOLALIQUES

I. **Historique.** — Nous avons vu comment STRECKER préparait l'acide cholalique en hydrolysant par la baryte aqueuse les sels de plomb des acides biliaires.

MYLIUS dans un premier travail essaya, en se basant sur les recherches de BUCHNER, de préparer l'acide cholalique à partir de la bile putréfiée. Il laissait putréfier de la bile de bœuf puis précipitait les acides biliaires par l'acide acétique. Ce précipité était dissous dans la lessive de soude ; la solution, après saturation de la soude caustique par l'acide carbonique, était évaporée par siccité.

Le résidu repris par l'alcool était enfin précipité par l'éther.

Après une série d'essais insuffisants MYLIUS recourut à l'hydrolyse directe de la bile par les alcalis caustiques et institua la méthode suivante devenue classique.

On fait bouillir la bile de bœuf avec la cinquième partie de son poids d'une solution de soude à 30 o/o, dans un vase de fer, pendant 24 heures, en ayant soin de remplacer de temps en temps l'eau évaporée.

La liqueur alcaline est ensuite saturée de gaz carbonique et évaporée presque à siccité. La masse restante est traitée par de l'alcool fort.

Le cholalate de soude reste en solution, tandis que le carbonate de sodium est précipité. La solution alcoolique contient pourtant en dehors du cholalate de sodium, du choléate de sodium et un sel de sodium à acide gras. On obtient la séparation du cholalate en faisant les sels de baryum. Le choléate de baryum et le sel de baryum à acide gras sont inso-

lubles dans l'eau, tandis que le cholalate de baryum se dissout dans 30 parties d'eau.

Pour réaliser cette séparation par les sels de baryum, la solution alcoolique biliaire est additionnée d'une grande quantité d'eau, de sorte qu'elle ne contient plus que 20 o/o d'alcool ; puis on traite par une solution étendue de chlorure de baryum qu'on ajoute aussi longtemps qu'il se forme un précipité. On filtre ensuite ; l'opération est rapide car les sels de baryum se déposent facilement. Par addition de HCl, l'acide cholalique se précipite à l'état de pureté de la liqueur filtrée.

La masse visqueuse prend ordinairement au bout de quelques heures la texture cristalline ; elle contient encore des parties amorphes, colorées, odorantes et a besoin encore d'une purification qu'on réalise par une cristallisation dans l'alcool.

Comme l'acide cholalique forme l'alcoolate $C^{24}H^{40}O^5 + C^2H^6O$ qui est décomposé par l'eau, il convient donc d'éviter la présence de l'eau et de prendre comme solvant l'alcool absolu, car autrement la formation de ces cristaux est contrariée.

Pour débarrasser l'acide cholalique de l'eau incorporée il est bon de le pétrir dans un vase en porcelaine avec un peu d'alcool, sur un bain-marie. L'alcool se combine immédiatement ; à sa place se sépare dans la masse visqueuse, de l'eau qu'on élimine par décantation.

On répète l'opération, avec une nouvelle quantité d'alcool jusqu'à ce qu'il n'y ait plus élimination d'eau.

Ordinairement la masse est obtenue à l'état cristallin. On la dissout à chaud avec la plus petite quantité possible d'alcool et on laisse refroidir la solution filtrée. On débarrasse des eaux mères la masse cristalline à l'aide de la trompe ; ces eaux mères sont toujours brunes et visqueuses ; elles contiennent une grande quantité d'acide cholalique.

MYLIUS ne put constater si, à côté de l'acide cholalique, il y avait un autre acide voisin ne formant pas un alcoolate cristallisable.

LASSAR-COHN (1) tout récemment a modifié la technique de MYLINS.

A cinq litres de bile de bœuf on ajoute 300 grammes de soude dissoute dans 900 centimètres cubes d'eau et on fait bouillir le mélange 24 heures, dans une marmite en fer, munie d'un couvercle couvrant bien. En réglant bien la flamme, il n'est pas nécessaire de rajouter de l'eau. Ensuite on enlève le couvercle et on porte pendant une heure à une vive ébullition. Puis on verse le contenu de la marmite dans une capsule de porcelaine qu'on chauffe légèrement. On sature par CO_2 la soude restée libre. Après cinq ou six heures le contenu de la capsule est devenu complètement huileux et on le fait couler brûlant dans trois litres d'alcool à 96 o/o, contenu dans un vase haut de forme. On abandonne au repos pendant 24 heures ; le sel de soude se dépose en grande partie. On filtre ensuite, on recueille ainsi sur filtre le sel de soude qui est devenu sableux, granuleux et qu'il est par suite facile de bien laver avec de l'alcool.

On dilue le filtrat avec quatre parties d'eau ; on le précipite avec une solution diluée de BaCl_2 . On laisse déposer le sel de baryum, on décante le liquide qui le recouvre en le jetant sur un filtre jusqu'à ce qu'on obtienne un filtrat clair. On précipite ce filtrat par l'acide acétique, on obtient l'acide cholalique sous forme de résine.

L'acide cholalique brut ainsi préparé est purifié par la méthode de MYLINS exposée plus haut.

De ces trois méthodes la première en date, celle de STRECKER, hydrolyse par la baryte aqueuse, est la plus scientifique ; elle lui a permis de séparer, au moins en partie, les deux termes de l'hydrolyse, acide cholalique et, glyocolle ou taurine. Les deux autres, au contraire, reposent sur une attaque brutale de la bile nature avec ses pigments, ses matières grasses, ses substances azotées. Tout l'azote est sans doute libéré à l'état d' AzH_3 mais sans qu'il soit possible de savoir si

(1) LASSAR-COHN, *loco-citato*, pages 31 et suivantes (traduction du Dr C. Piettre).

cet azote est enlevé aux sels biliaires eux-mêmes ou aux acides amidés après hydrolyse et, dans ce dernier cas, ce que devient le reste de ces groupes amidés.

Pour nous la seule méthode rigoureuse est l'hydrolyse par *les acides*, hydrolyse portant sur les acides ou sels biliaires préparés à l'état de pureté.

Sans doute elle présente l'inconvénient de fournir des acides cholaliques qui, pour des raisons encore mal connues, ne cristallisent pas ou très difficilement, et ce point avait été d'ailleurs bien constaté avant nous. En effet, l'hydrolyse, par l'acide chlorhydrique, de l'acide glycocholique, par exemple, avait donné aux auteurs deux acides non cristallisés, *acide cholonique* de MÜLDER et *acide cholidinique* de STRECKER.

Mais l'hydrolyse acide a l'avantage de pouvoir réaliser une scission quantitative du composé biliaire en ses deux composants principaux.

C'est cette méthode que nous avons adoptée pour préparer les acides cholaliques de diverses origines.

Le premier résultat important a été de constater que ces noyaux cholaliques ne sont pas absolument identiques, qu'ils ne possèdent pas exactement les mêmes propriétés et qu'il y a nécessité de les séparer désormais dans la nomenclature chimique et physiologique.

Pour ces raisons nous proposons d'appeler acides *glycocholaliques* les acides cholaliques provenant de l'hydrolyse des acides glycocholiques et acides *tauro-cholaliques* ceux qui résultent du dédoublement des acides taurocholiques.

II. Acide glycocholalique. — Nous avons indiqué déjà sa préparation à partir de l'acide glycocholique pur de la bile de porc, par hydrolyse sulfurique.

Sous l'influence de l'acide, tout l'Az du sel biliaire se sépare, comme nous l'avons déjà montré, à l'état de glyocolle qui cristallise. L'acide glyco-cholalique est résineux, blond, *sans aucune saveur*, insoluble dans l'eau, les acides, l'éther, le chloroforme, soluble dans les alcalis, les alcools. Il se ramollit

dans l'eau bouillante, puis devient sec, friable par refroidissement.

Les essais de cristallisation dans l'alcool n'ont pas été satisfaisants.

Combustion

$$\text{I. Matière} = 0,2927 \left\{ \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 0,8035 \\ \text{Eau} = 0,2482 \end{array} \right.$$

$$\text{II. Matière} = 0,2449 \left\{ \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 0,6683 \\ \text{Eau} = 0,2096 \end{array} \right.$$

soit en centièmes :

$$\text{C} = 75,15$$

$$\text{H} = 9,4$$

$$\text{O} = 15,2$$

Ces résultats correspondent à la formule $\text{C}^{25}\text{H}^{40}\text{O}^4$ calculée pour :

$$\text{C} = 74,62$$

$$\text{H} = 9,45$$

$$\text{O} = 15,92$$

L'équation classique du dédoublement de l'acide glycocholique :



devient donc dans nos expériences :



Il y a entre les deux équations une simple différence d'une molécule d'eau.

Il est possible que l'équation (2) corresponde à la fin de la réaction hydrolytique. Celle-ci, nous l'avons vu page 7, paraît, en effet, très nettement se faire en deux étapes ; la première est très rapide et dure à peine 3 à 4 heures c'est la phase de libération du noyau cholalique avec fixation d'eau très probablement ; la deuxième se produit pendant le chauffage prolongé de l'acide cholalique en milieu relativement très riche en acide, c'est la phase de déshydratation qui se traduit par un brunissement de la matière et une insolubilisation progressive dans les alcalis.

La propriété la plus intéressante de l'acide glycocholique

est de distiller à la pression ordinaire ou mieux sous pression réduite.

Dans une expérience nous avons soumis à la distillation, à la pression atmosphérique, 20 grammes d'acide cholalique provenant d'une hydrolyse à 30 o/o.

La matière séchée à poids constant est mise dans un ballon de WURTZ, muni d'un thermomètre.

Par chauffage elle se ramollit et prend l'aspect d'une huile blonde épaisse, visqueuse. A partir de 300° il se dégage une petite quantité de vapeur d'eau qui se condense dans le ballon récepteur, puis vers 350° des fumées blanches s'élèvent au-dessus du bain liquide. Entre 360 et 400° il passe en abondance une huile qui se solidifie très vite sous forme d'une masse vitreuse, blonde. Il reste dans le ballon un résidu goudronneux très foncé.

On recueille 11 gr. 5 de distillat.

On le redistille aussitôt sous une pression réduite de 18 mm. de mercure.

Entre 200° et 250° léger départ d'eau avec chute de pression ; puis de 290° à 310° passe la presque totalité de la substance avec les mêmes caractères que plus haut.

On obtient ainsi 7 grammes d'une substance à peine colorée qui après refroidissement a acquis la consistance d'une gomme résine. Elle ne possède aucune saveur ; sous la dent elle s'écrase, se ramollit sans se dissoudre et donne l'impression de la colophane.

Elle est soluble dans l'éther, l'alcool, l'acide acétique concentré.

Sa fonction chimique est celle d'un acide faible ; on lui donne par passage à l'état de sel alcalin, suivi de précipitation par les acides, une forme solide qui le rend facile à manier. C'est alors une matière très légèrement jaunâtre qui après pulvérisation est séchée puis analysée.

Combustion

$$\begin{array}{l} \text{I. Matière} = 0,2958 \quad \left| \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 0,8418 \\ \text{Eau} = 0,2568 \end{array} \right. \end{array}$$

II. Matière = 0,3013		Acide carbonique = 0,8552
		Eau = 0,260
soit en centièmes :		
		C = 77,6
		H = 9,7
		O = 12,7
Calculé pour $C^{25}H^{38}O^3$:		
		C = 77,72
		H = 9,84
		O = 12,43

Si on rapproche cette formule de celle de l'acide cholalique on a :



La distillation a donc provoqué le départ d'une molécule d'eau.

Les essais de réduction sur l'acide glycocholalique n'ont donné aucun résultat intéressant.

L'oxydation a été tentée dans les mêmes conditions que pour l'acide taurocholalique; il en sera question à ce moment.

III. Acides taurocholaliques. — Nous les obtenons également par l'hydrolyse acide; ce sont des matières non azotées, de coloration blonde, sans aucune *amertume*.

L'analyse élémentaire donne pour l'acide provenant de l'hydrolyse du taurocholate amorphe de la bile de chien.

Combustion

I. Matière = 0,2590		Acide carbonique = 0,6527
		Eau = 0,2098
II. Matière = 0,2628		Acide carbonique = 0,6652
		Eau = 0,2175
soit en centièmes :		

	I	II
C	68,96	69 21
H	9,00	9,19

On peut obtenir de la même façon les acides cholaliques des autres espèces, mais sans doute avec une moins grande certitude, puisqu'on ne dispose que de taurocholates moins purs.

Ce sont encore des substances totalement insapides.

Combustions

Acide cholalique (veau) :

I. Matière = 0,3939	Acide carbonique = 1,024
	Eau = 0,3393
II. Matière = 0,2731	Acide carbonique = 0,6912
	Eau = 0,2341

soit en centièmes :

C = 70,20
H = 9,48
O = 20,32

Acide cholalique (congre) :

I. Matière = 0,2792	Acide carbonique = 0,6052
	Eau = 0,2393
II. Matière = 0,3019	Acide carbonique = 0,6595
	Eau = 0,2543

soit en centièmes :

C = 60,02
H = 9,43
O = 30,50

Toutes ces substances sont des acides monobasiques faibles, donnant des sels alcalins solubles, des sels lourds insolubles dans l'eau mais presque tous solubles dans l'alcool.

Les essais de cristallisation dans l'alcool n'ont donné aucun résultat.

La distillation à la pression ordinaire ou sous pression réduite donne des résultats médiocres; et c'est là une différence très nette avec l'acide glycocholalique.

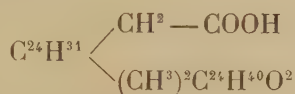
Dans une expérience, 8 grammes d'acide cholalique de chien ont été soumis à la distillation, dans le vide, sous 16 millimètres de mercure. La matière fond en donnant un liquide huileux, à peine coloré. Vers 190-200°, il se produit un très faible départ d'eau, puis à 240° des vapeurs qui se condensent en de fines gouttelettes, très réfringentes, de coloration jaune citrin. Dès que la température a atteint 300°, la matière se colore fortement en brun sans qu'il distille rien d'appréciable.

IV. Action des réducteurs. Acide hydrotaurocholalique. — La réduction de l'acide taurocholalique nous a donné un très beau produit sur la préparation duquel nous insisterons.

Peu de recherches ont été faites dans cette voie.

MYLIUS, le premier, a décrit un produit de réduction obtenu par la voie biologique sous l'influence de la putréfaction, l'acide *désoxycholique* $C^{24}H^{40}O^4$.

PRÈGLES (1) en traitant l'acide cholalique par le phosphore rouge et l'acide iodhydrique obtint une substance à fonction acide qu'il appela acide *monocarbonique*, à laquelle il attribua la formule développée :



Enfin SENKOWSKY (2), prépara par réduction un anhydride de formule $C^{24}H^{40}O^2$ auquel il donna le nom d'acide *cholilique*.

Les réducteurs acides ne peuvent être employés facilement à cause du peu de solubilité des acides biliaires dans ces réactifs.

Nos recherches ont surtout porté sur les réducteurs alcalins.

C'est l'acide cholalique provenant de la bile de bœuf qui nous a servi de matière première dans nos essais.

L'action du zinc en liqueur alcaline est sans effet utile.

De même l'amalgame de sodium, même très riche en sodium, est un réactif insuffisamment énergique.

Au contraire le sodium en liqueur alcoolique est le réducteur par excellence dans le cas particulier.

Nous avons dû abandonner l'emploi de l'alcool éthylique à cause des difficultés qu'on éprouve à isoler le produit biliaire de réduction.

L'alcool amylique est le solvant de choix.

On part d'un poids connu d'acide taurocholalique que l'on dissout dans un grand volume d'alcool amylique. La dissolution lente à froid est obtenue rapidement à chaud. On engage à chaque opération, une faible quantité de matière,

(1) PRÈGLES, *Comptes rendus Académie de Vienne*, 111, 1902.

(2) SENKOWSKY, *Archives de pharmacie*, 71; *Monadelph. fur. chem.*, 19.

de 5 à 10 grammes au maximum, pour 500 à 1.000 centimètres cubes d'alcool.

La liqueur amylique versée dans un ballon muni d'un long tube de condensation, est chauffée au bain-marie tiède. On y projette alors du sodium en gros fragments.

Le métal provoque un abondant dégagement d'hydrogène, puis passe à l'état d'amylate de soude soluble dans l'excès d'alcool amylique.

On agite fréquemment pour bien mélanger les couches liquides.

Dès qu'on a ajouté de 80 à 90 grammes de sodium par litre, l'opération est terminée, et l'alcool est presque totalement sodé.

On a une liqueur épaisse, sirupeuse, qu'on chauffe au bain-marie bouillant jusqu'à complète dissolution des petits morceaux de sodium.

On ajoute alors un égal volume d'eau. Le mélange est versé dans une boule à robinet, puis vivement agité. Il se sépare deux couches bien distinctes : une inférieure incolore, une supérieure huileuse, colorée légèrement en brun.

On décante la partie aqueuse qui entraîne une très grande quantité de soude par suite de la décomposition de l'amylate de sodium.

Il ne passe que des traces de substances organiques que l'on peut d'ailleurs isoler en neutralisant la base alcaline.

L'acide cholalique et son produit de réduction restent dans la couche supérieure en solution dans l'alcool amylique. On soumet cette liqueur alcoolique à une série de lavage à l'eau distillée puis à l'acide chlorhydrique étendu, enfin de nouveau à l'eau jusqu'à neutralité complète.

La solution alcoolique bien égouttée, est soumise au bain-marie bouillant à la distillation en s'aidant du vide.

L'alcool amylique distille, on pousse l'opération le plus loin possible ; il est en effet très important d'éliminer la totalité de l'alcool.

Il reste dans le ballon un produit blond, résineux, liquide

à chaud, presque solide à froid, et qui possède une curieuse odeur de moisi.

On le reprend par un très petit volume d'éther anhydre. La dissolution est lente ; parfois pendant qu'elle se poursuit on voit apparaître un léger précipité, grenu, extrêmement blanc.

Lorsqu'il se produit on le recueille rapidement sur trompe ; on le lave avec de petites quantités d'éther puis on le met à sécher sur vide sulfurique.

La solution éthérée est mise à cristalliser, c'est le point le plus délicat de la préparation.

La cristallisation a lieu par évaporation très lente de l'éther.

Si ce solvant distille trop vite, on retrouve la matière à l'état amorphe.

Le procédé le plus sûr pour obtenir des cristaux consiste à verser la solution éthérée dans un ballon à fond rond, d'assez grand volume qu'on incline à environ 45°. L'éther s'évapore lentement et la substance cristallise, Cela demande plusieurs heures parfois un ou plusieurs jours. Au sein de la masse sirupeuse on observe la formation d'un fin semis cristallin, blanchâtre, uniformément réparti ou de petits agglomérats analogues comme forme à des trémis de sel marin.

C'est, en effet, sous ces deux états que se déposent le produit de réduction ; le premier représente une cristallisation relativement rapide, le deuxième une cristallisation très lente.

On isole les cristaux du milieu amorphe par addition d'éther anhydre.

Ils sont recueillis sur filtre à succion et lavés à l'éther.

Comme plus haut on reprend les solutions éthérées et on les soumet à nouveau à la cristallisation jusqu'à épuisement.

La présence d'alcool amylique gêne et peut même empêcher la formation de cristaux parce qu'il dissout les substances biliaires.

Lorsqu'après une ou plusieurs cristallisation, on n'obtient plus rien, il suffit parfois de soumettre le résidu à une nou-

velle distillation dans le vide pour enlever des traces d'amylique et obtenir une nouvelle récolte de cristaux.

De même si on réduit le résidu amorphe on peut isoler également de cristaux.

Le rendement atteint 25 o/o mais sans le dépasser même dans les meilleures conditions de réduction et de cristallisation.

La technique s'applique avec le même succès aux acides taurocholaliques de veau et de chien.

Avec la bile de congre nous n'avons obtenu que des quantités très petites de produit cristallisé et nous nous proposons de reprendre ces essais.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

1. *Acide taurocholalique de bœuf*. — On part de 5 grammes d'acide cholalique.

On dissout dans 500 centimètres cubes d'alcool amylique et on sature de sodium en morceaux (38 gr. ont été utilisés). L'opération dure trois heures.

On ajoute 500 centimètres cubes d'eau distillée et on agite pour saponifier l'amylate de sodium, puis on verse dans une boule à robinet. Après une demi-heure de repos, l'alcool amylique s'est rassemblé à la surface de du liquide aqueux.

On le sépare et après lavage à l'eau, à l'acide chlorhydrique, puis de nouveau à l'eau jusqu'à neutralité, on distille, au bain-marie, à chaud, dans le vide.

Le résidu est repris avec soin par 125 centimètres cubes d'éther anhydre, sans qu'il se produise de cristallisation. Le lendemain dans le ballon incliné l'éther a presque totalement disparu; il reste une substance sirupeuse, presque incolore, tenant en suspension une petite quantité de matière blanche, cristalline; en outre toute la paroi du ballon mouillée par la solution étherée est tapissée de cristaux.

On verse alors 80 centimètres cubes environ d'éther; la partie amorphe se dissout peu à peu, libérant ainsi un précipité blanc, très brillant; avec un agitateur muni à son extrémité d'un revêtement en caoutchouc, on détache les croûtes cristallines adhérant aux parois du récipient.

L'ensemble est recueilli sur filtre à succion, lavé avec 50 centimètres cubes d'éther et séché. Poids du produit = 0,60.

Une deuxième cristallisation donne 0,35.

Une troisième = 0,20.

Ces 5 grammes d'acide ont donc en tout donné 1,14 de substance cristallisée, c'est-à-dire 22 gr. 8 pour 100.

2° On dissout 7 grammes d'acide cholalique dans 800 centimètres cubes d'alcool amylique; la réduction est faite à l'aide de 55 grammes de sodium.

Après enlèvement de la soude par lavages successifs à l'eau et à l'acide chlorhydrique, et distillation de l'alcool amylique, on obtient par simple addition d'éther une première cristallisation du poids de 0 gr. 45.

La reprise à l'éther donne par évaporation lente de gros cristaux groupés en amas; P = 0,90.

Enfin une troisième cristallisation isole 0,35 de matière.

Le rendement s'élève ici à 1 gr. 70, c'est-à-dire à 24,28 o/o.

Les résidus de cristallisation de ces deux opérations ont été réunis, dissous dans la soude, puis reprécipités par l'acide chlorhydrique, lavés à neutralité et séchés.

Nous avons recherché par l'absorption d'iode (chiffre d'HÜBL) l'état de saturation de cette substance.

I. Matière = 0,30 iode absorbé = 0,152 indice d'iode = 50,66

II. Matière = 0,250 — — = 0,135 — — = 54

Il s'agit donc d'un produit non saturé.

Soumis à une nouvelle réduction il n'a donné aucune cristallisation.

2. *Acide taurocholalique de veau*. — Deux expériences ont été faites :

I. 5 grammes de cholalique réduits par 38 grammes de sodium ont donné 1 gr. 22 de substance cristallisée, soit 24,4 o/o.

II. 10 grammes de cholalique traités par 85 grammes de sodium ont donné 2 gr. 51 de cristaux, soit 25,1 o/o.

3. *Acide taurocholalique de chien*. — Même rendement de 23 à 25 o/o.

Le résidu amorphe soumis à la méthode de HÜBL absorbe en moyenne 49,1 d'iode pour 100, chiffre très voisin de celui indiqué pour le bœuf.

Les différents produits cristallisés obtenus par réduction ont été analysés.

Combustions

Bœuf :	I. Matière = 0,3597	Acide carbonique = 0,9296
		Eau = 0,3302
II. Matière = 0,2400		Acide carbonique = 0,6184
		Eau = 0,2182

soit en centièmes :

Trouvé	Calculé pour $C^{24}H^{42}O^5$
C = 70,30	70,44
H = 10,16	10,12
O = 19,56	19,50

Veau :	I. Matière = 0,2013	Acide carbonique = 0,5175
		Eau = 0,1846

$$\text{II. Matière} = 0,3181 \quad \left| \quad \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 0,8154 \\ \text{Eau} = 0,2942 \end{array} \right.$$

soit en centièmes :

Trouvé

$$\text{C} = 70,03$$

$$\text{H} = 10,23$$

$$\text{Chien: I. Matière} = 0,3924 \quad \left| \quad \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 1,0059 \\ \text{Eau} = 0,3581 \end{array} \right.$$

$$\text{II. Matière} = 0,2334 \quad \left| \quad \begin{array}{l} \text{Acide carbonique} = 0,6009 \\ \text{Eau} = 0,2155 \end{array} \right.$$

soit en centièmes :

Trouvé

$$\text{C} = 70,05$$

$$\text{H} = 10,19$$

Il s'agit bien d'un même produit de réduction de l'acide taurocholalique, nous l'appellerons *acide hydro-taurocholalique*.

L'équation suivante rend compte des rapports qui existent entre les deux substances :



Cette fixation d'hydrogène est nettement démontrée :

1° Par l'analyse. Tandis que dans l'acide cholalique le pourcentage moyen de l'hydrogène est de 9,4 d'après nos analyses et de 9,8 au maximum d'après les analyses des auteurs ; il s'élève toujours au-dessus de 10 o/o ; de 10,13 à 10,30 o/o dans son produit de réduction. Cette différence en hydrogène paraît sans doute peu importante, mais elle acquiert une réelle valeur, étant donnée la hauteur moléculaire des substances analysées.

2° Par l'abaissement considérable de l'indice d'iode.

Si on détermine le chiffre d'HÜBL pour l'acide cholalique on trouve dans le cas du cholalique de chien les chiffres suivants :

I. Matière, 0,3696 ont absorbé 0,181 d'iode, c.-à-d. 48,96 o/o.

II. — 0,3999 — 0,205 — — 51,26 o/o.

La même détermination faite sur l'acide hydrotaurocholalique cristallisé qui en dérive donne :

I. Matière, 0,3411 ont absorbé 0,048 d'iode, c.-à-d. 14,07 o/o.

II. — 0,5121 — 0,063 — 12,30 o/o.

3° Enfin par la non cristallisation avant toute réduction.

En effet, si on essaie de faire cristalliser l'acide cholalique dans les mêmes conditions, c'est-à-dire, en passant par l'alcool amylique, puis par l'éther, on n'obtient aucun résultat.

Mêmes résultats négatifs avec les sels biliaires, glycocholates ou taurocholates.

Propriétés chimiques et physiques. — L'acide hydrotaurocholalique est un acide faible possédant un seul carboxyl.

La quantité de métal alcalin nécessaire à la saturation de cette fonction acide a été déterminée par la méthode classique :

1. 0 gr. 3647 de substance cristallisée sont dissous dans 40 centimètres cubes d'alcool à 95°, étendus de 15 centimètres cubes d'eau distillée, on titre avec la liqueur décime de soude en présence de phénolphtaléine.

Il a fallu verser 9 cc. 5 de cette liqueur pour faire virer l'indicateur.

0 gr. 3647 ont donc absorbé 0,0218 de sodium, c'est-à-dire 5,96 o/o de Na.

2. Dans une deuxième expérience : 0 gr. 842 ont absorbé 21,23 de solution sodique N/10, c'est-à-dire 0,0488 de Na et o/o = 5,79.

L'acide absorbe donc en moyenne 5,88 o/o de Na ; la formule exige théoriquement 5,60.

C'est une très belle substance qui se présente sous deux aspects suivant que la cristallisation se fait lentement ou avec rapidité, comme nous l'avons déjà dit.

Dans le premier cas elle est à peu près incolore ; ce sont de gros prismes accolés qui polarisent fortement la lumière.

Dans le second cas elle est d'une blancheur éclatante ; au microscope, les cristaux sont lancéolés et polarisent très énergiquement.

Elle ne possède aucune odeur, sa saveur est nulle : sous la dent elle s'écrase et se ramollit sans se dissoudre.

L'acide hydrotaurocholalique fond vers 180° en se ramollissant. Chauffé avec précaution sur la lame de platine il fond et s'étale comme les corps gras en une huile qui brûle en distillant partiellement et sans laisser de cendres.

Chez tous les animaux, bœuf, veau, chien, ces caractères sont les mêmes. Avec la bile de congre, nous n'avons obtenu que la forme en navicelle et seulement en très petite quantité.

Sa solubilité est très grande dans l'alcool, très faible dans l'éther :

100 centimètres cubes d'éther saturé à l'ébullition ont dissous dans un cas, 0,180 et dans un autre, 0,194, c'est-à-dire 0,187 en moyenne.

Dans l'eau il est encore moins soluble :

100 centimètres cubes d'eau saturée à l'ébullition ont dissous ; dans un cas, 0,014 ; dans un deuxième, 0,022 ; solubilité moyenne, 0,918 pour cent.

Pouvoir rotatoire spécifique, $Ad = + 54^{\circ}46'$.

Dans l'acide acétique glacial, la solubilité est de 9,762 0/0 à la température de 15° .

La cryoscopie a été tentée dans ce dernier solvant, mais ne nous a pas donné de chiffres suffisamment concordants. Nous avons, en effet, constaté des variations assez sensibles pour des abaissements cryoscopiques très faibles.

Il nous a semblé d'ailleurs que dans ces expériences la matière ne reste pas indifférente en présence d'acide acétique et peut s'y combiner.

Par évaporation lente de l'acide acétique, l'acide hydrotaurocholalique cristallise sous forme d'une belle substance blanche, en lames aplaties polarisant la lumière.

V. Action des oxydants. — En soumettant l'acide cholalique à l'action des oxydants, les auteurs ont obtenu plusieurs composés différents :

L'acide *déhydrocholique* de MYLIUS ($C^{24}H^{34}O^5$) contenant

une fonction acide et deux fonctions aldéhydes, représente par les formules :



L'acide *bilianique* de CLÈVES ($C^{24}H^{34}O^8$) acide tribasique : $C^{21}H^{31}O^2-(COOH)^3$ et qui, d'après LASSAR-COHN et PRÈGLES, serait un mélange d'acide bilianique et *isobilianique*.

L'acide *sylianique* ($C^{24}H^{33}O^2$).

Enfin, par oxydation avancée de ce dernier, l'acide *cholestérique* (SENKOWSKY) et l'acide *phtalique*.

Nous avons aussi étudié rapidement l'action sur les acides cholaliques de certains oxydants acides ou alcalins : acide sulfo-chromique, acéto-chromique, ferricyanure alcalin, permanganate de potasse.

1. *Acide sulfo-chromique*. — On traite 50 grammes d'acide taurocholalique de bœuf par 500 centimètres cubes d'un mélange sulfo-chromique à 24 grammes d'oxygène par litre. Après 3 heures de chauffage à petite ébullition, la substance organique se rassemble à la surface du liquide, puis se prend en une masse molle à chaud, dure et cassante à froid.

Pulvérisée, lavée pour enlever tout le sulfate de sesquioxyde de chrome ; elle est dissoute dans la soude, puis précipitée par SO^4H^2 . On recueille 20 grammes seulement de cette substance.

L'oxydation a donc détruit 60 o/o d'acide biliaire.

2. *Acide acéto-chromique*. — On emploie une liqueur composée de 150 centimètres cubes d'acide acétique pour 12 grammes d'acide chromique.

Il se produit ici aussi une combustion énergique sans modification de l'acide cholalique résiduel.

45 o/o de matière sont brûlés.

3. *Ferricyanure alcalin*. — Cet oxydant agit par déshydrogénation ; l'enlèvement d'hydrogène se fait, dans la série cyclique, aux dépens des hydrogènes périphériques, comme l'a établi M. ETARD pour le camphre.

Le réactif est fait en dissolvant 165 grammes de ferricyanure de potassium et 28 grammes de KOH dans 4 litres d'eau dis-

tillée. L'oxygène disponible est donc de 8 grammes d'après la formule classique.

On répartit également dans 3 ballons et on ajoute à chacun 5 grammes d'acide cholalique dissous dans 50 grammes d'eau à 20 o/o de carbonate de soude.

On laisse en contact et on agite de temps en temps.

Au bout de 11 jours (bien que l'oxydation soit loin d'être achevée), on traite le contenu d'un des ballons. On évapore au bain-marie, on sèche à l'étuve à 40° et on épuise à l'alcool éthylique fort qui enlève les matières organiques. Après filtration, on chasse la liqueur alcoolique, on reprend par l'eau distillée alcaline et on acidifie par SO^4H^2 étendu. On obtient une matière brune qui est de l'acide cholalique à peu près intact. Le deuxième ballon traité de la même façon au bout de 18 jours donne en moindre quantité, une matière beaucoup moins colorée, partiellement soluble dans l'alcool et l'éther.

Du troisième ballon, laissé pendant 25 jours en réaction on ne retire que 1 gr. 3 de matière organique amorphe, totalement incolore et complètement soluble dans l'éther.

Le peu de substance ne nous a pas permis d'en faire l'analyse ; mais ce procédé nous paraît devoir être intéressant et mériter d'être repris.

4. *Permanganate en liqueur alcaline.* — Cet oxydant nous a donné de meilleurs résultats.

On dissout 15 grammes d'acide glycocholalique de porc dans 200 centimètres cubes de carbonate de soude et on étend à un litre et demi. Le tout est versé dans une capsule de 5 litres et chauffé au bain-marie à la température de 50 à 60°. On ajoute peu à peu et en agitant 3 litres d'une solution de permanganate de potasse à 10 o/o. L'opération dure 3 heures.

L'excès de MnO^4K est réduit par du bisulfite de soude. Le bioxyde de manganèse hydraté est rassemblé par une courte ébullition, puis filtré et lavé. La liqueur et les eaux de lavage sont concentrées à 500 centimètres cubes et acidifiées par SO^4H^2 . Des torrents d'acide carbonique se dégagent et il se

précipite, en flocons très blancs, une belle matière qui filtrée, lavée et séchée, pèse 6 grammes.

Cette substance épuisée à l'éther lui abandonne 3 gr. 8, le reste est soluble dans l'alcool méthylique.

L'évaporation lente des deux liqueurs, alcool et éther, ne donne pas de cristallisation.

On soumet à l'analyse la partie soluble dans l'éther :

Combustion

I. Matière = 0,5278	Acide carbonique = 1,2384
	Eau = 0,3853
II. Matière = 0,3251	Acide carbonique = 0,7682
	Eau = 0,2376

soit en centièmes :

Trouvé	Calculé pour $C^{25}H^{28}O^8$
C = 64,35	64,37
H = 8,18	8,11
O = 28,6	77,46

Le produit obtenu est un acide de formule très voisine de celle de l'acide bilianique de CLÈVES.

Dans une autre expérience faite avec de l'acide taurocholalique de chien, l'analyse élémentaire a donné pour la partie soluble dans l'alcool :

Combustion

I. Matière = 0,2485	Acide carbonique = 0,6347
	Eau = 0,1990
II. Matière = 0,3360	Acide carbonique = 0,8711
	Eau = 0,2688

soit en centièmes :

C = 69,82
H = 8,89

Dans ces réactions, seule la partie soluble dans l'éther a donc été oxydée.

VI. *Acétylation*. — Les méthodes d'oxydation n'ayant apporté aucune notion positive sur la manière dont l'oxygène est lié

dans la molécule des acides cholaliques, les auteurs ont essayé les procédés d'acétylation.

Théoriquement on avait admis que dans la formule $C^{24}H^{40}O^5$ les trois oxygènes n'appartenant pas au groupe carboxylique pouvaient être liés à des groupes hydroxyles ou cétoniques.

SCHOTTEN, le premier, avait conclu de ses travaux que non seulement il n'y avait aucune raison d'admettre l'existence de groupes alcooliques mais même qu'il fallait rejeter cette hypothèse.

MYLIUS reprit cette étude et s'efforça de démontrer par les expériences suivantes l'existence de trois oxhydroyles alcooliques dans le noyau cholalique.

Si on part d'une solution d'acide cholalique dans l'acide acétique et qu'on le sature à froid d'HCl, on obtient bientôt un précipité qui paraît être comme le produit d'addition d'une molécule d'HCl à une molécule d'acide cholalique ($C^{24}H^{40}O^5 + HCl$). Après quelques heures de contact ce précipité se dissout. L'addition d'eau précipite alors un acide dont la solution très diluée dans l'ammoniac est précipité par le chlorure de baryum. Le sel de baryum traité par HCl libère un corps de formule $C^{24}H^{39}(C^2H^3O)O^5$, c'est l'acide mono-acétyl-cholalique.

D'autre part un poids donné d'acide cholalique est traité par le double de son poids d'anhydride acétique. La dissolution est obtenue en quelques heures. Si on précipite cette solution avec de l'eau, on obtient un produit résineux qu'on précipite de nouveau dans une solution étendue $BaCl^2$. Le sel de baryum ainsi préparé donne, par traitement à HCl, un acide qui peut être représenté par la formule $C^{24}H^{38}O^5(C^2H^3O)^2$ et qui s'appelle l'acide diacétylcholalique.

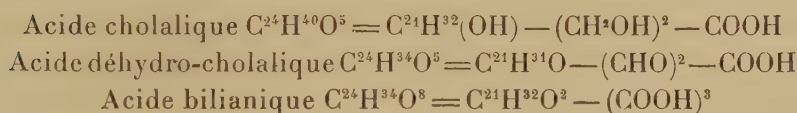
Pour MYLIUS, dans ces deux séries d'expériences, il s'agissait bien de produits acétylés puisque la saponification par la soude donnait l'acide cholalique et de l'acide acétique.

L'existence du troisième hydroxyl alcoolique est démontrée, suivant lui, d'une façon indirecte par les réactions de l'acide déhydrocholalique de formule $C^{24}H^{36}O^5$.

Mais d'autre part LATSCHINOFF, puis CLÈVES, ont obtenu par l'oxydation de ce même acide déhydrocholalique l'acide bilianique, tribasique.

Il faudrait donc conclure contrairement à l'opinion de MYLIUS, que le troisième hydroxyl est plutôt une fonction cétonique parce que s'il était un groupe alcoolique, par oxydation, il devrait donner un quatrième carboxyl, ce qui n'a pas lieu.

MYLIUS représente de la façon suivante les relations théoriques entre l'acide cholalique et son terme ultime l'acide bilianique.



Nous avons essayé sur l'acide cholalique les différents procédés d'acétylation ; dissolution de l'acide cholalique dans l'acide acétique glacial et saturation à froid d'HCl, dissolution d'acide cholalique dans l'anhydrite acétique et addition de chlorure d'acétyl à chaud en présence de chlorure de zinc anhydre comme agent de condensation,

Dans aucun cas, de même que SCHOTTEN, nous n'avons obtenu de produit cristallisé ou même de produit amorphe ayant une composition constante.

Des essais de benzoïlation, en liqueur alcaline étendue, ne nous a pas donné de meilleurs résultats.

Pour nous, la structure moléculaire des acides cholaliques reste donc inconnue. C'est un problème très délicat dont la solution exigera encore bien des efforts.

QUATRIÈME PARTIE

PIGMENTS BILIAIRES

CHAPITRE PREMIER

TRAITEMENT DES CALCULS BILIAIRES

Nous ne parlerons dans ce travail que des deux principaux pigments biliaires ; le pigment jaune-orangé ou bilirubine et le pigment vert ou biliverdine ; les autres matières colorantes les plus connues sont, au même titre que la biliverdine, et d'après les conceptions classiques, des dérivés de la bilirubine.

Par oxydation : bilicyanine, cholétéline.

Par hydratation simple : bilifuscine.

Par hydratation et oxydation : bilyprazine.

Par réduction et hydratation : hydrobilirubine.

I. Historique. — Nous étudierons d'abord la bilirubine qui pratiquement est obtenue à partir des calculs biliaires.

STEDLER (1) qui lui a donné son nom l'a retirée des calculs biliaires d'après le procédé suivant : les calculs sont réduits en poudre et épuisés successivement par l'éther, l'eau et l'acide chlorhydrique étendu. Le résidu bien lavé est traité ensuite par du chloroforme bouillant ; on élimine par distil-

(1) STEDELER, *Viert. d. nat. Gesell. in Zurich.*, t. VIII, 1862.

lation l'excès de solvant et le résidu est traité par un excès d'alcool qui précipite la plus grande partie de la bilirubine. Pour purifier le produit obtenu on le redissout dans le chloroforme chaud et on le précipite à nouveau sous forme d'une poudre orangée analogue au sulfure d'antimoine.

THUDICHUM (1) reprenant les travaux de STÖEDLER indique aussi une technique d'extraction.

Les calculs finement pulvérisés sont lavés à l'eau bouillante à plusieurs reprises. La poudre obtenue est chauffée avec de l'alcool fort qui enlève différentes matières ainsi que la cholestérine. Le résidu est mis à digérer avec HCl froid, repris de nouveau par l'alcool et traité par l'éther. La poudre est alors traitée par du chloroforme bouillant. On distille la solution obtenue. Le résidu est filtré et lavé au chloroforme froid tant qu'il possède une couleur verte. Les liqueurs de lavages sont concentrées dans un appareil à distillation et étendues enfin d'alcool qui précipite la bilirubine. Ces recherches restées classiques jusqu'en ces dernières années ont été reprises récemment lorsqu'on eut découvert l'existence entre le pigment sanguin et le pigment biliaire de relations importantes à la fois au point de vue chimique et physiologique.

En 1901 KÜSTER publie un long et remarquable travail sur la bilirubine qu'il complète en 1905 comme nous allons l'exposer plus loin.

En 1905 deux chimistes américains, ONDORP et TEEPLE (2), disposant de grandes quantités de calculs biliaires provenant des abattoirs de la maison Armour, à Chicago, donnent une méthode de préparation du pigment orangé de la bile.

Les calculs biliaires bien séchés sont réduits en poudre très fine, épuisés à l'éther au soxhlet pendant 12 à 20 heures, séchés de nouveau et épuisés avec du chloroforme 30 à 40 heures.

(1) THUDICHUM, *J. of the Chem. Soc.*, 1875, XIII et *ibidem.*, 1876 et *Journ. Prakt. Chem.*, t. CIV, p. 193.

(2) ONDORP and TEEPLE, *American chemical journal*, 1905.

La matière débarrassée de chloroforme par évaporation en large surface est épuisée par de l'eau bouillante.

Par ces traitements successifs se trouvent éliminés les léci-
thines, cholestérines, bilirubine non combinée, bile concrétée
et les autres pigments solubles dans l'éther, le chloroforme et
l'eau.

Le résidu, de coloration rouge foncé, est mis en digestion
plusieurs heures avec HCl très dilué, filtré et lavé jusqu'à ce
que les eaux n'entraînent plus de chlore ou de chaux.

La poudre séchée est épuisée pendant 2 heures avec l'éther,
6 heures avec de l'alcool absolu, et avec le chloroforme jus-
qu'à ce que ce solvant ne se colorent plus (125 heures envi-
ron); chaque 8 heures le chloroforme est renouvelé.

On fait toutes ces manipulations à l'abri de la lumière
(dans une chambre noire).

Les extraits chloroformiques sont concentrés au bain-marie
par distillation de CHCl_3 . L'addition d'alcool précipite la bili-
rubine qui est recueillie, bouillie plusieurs fois avec de
l'alcool pour éliminer les pigments étrangers, bilifusine,
biliprasine, etc.

Les produits ainsi obtenus, bien que ne laissant pas de cen-
dres par combustion, ne sont pas complètement solubles dans
 CHCl_3 ; le résidu est d'ailleurs faible.

On fait bouillir la bilirubine avec de grandes quantités de
chloroforme on filtre, on précipite par l'alcool et cela à deux
reprises successives.

Le pigment est purifié par dissolution et cristallisation dans
la diméthylaniline, comme l'avait indiqué déjà W. KÜSTER.

Dans une expérience, 130 grammes de calculs biliaires
séchés à 110° , ont donné d'après cette technique :

Extrait étheré.	8 gr.
— chloroformique.	5 gr. 2
— aqueux	9,5
— chlorhydrique aqueux.	20
— étheré.	1,1
— alcoolique	2
Bilirubine.	22,5
Résidu (bilihumine)	60

Les auteurs concluent, d'une longue série d'analyses de leur produit, à la formule $C^{16}H^{18}N^2O^2$.

La méthode de W. KÜSTER (1) est un peu différente.

La poudre des calculs est traitée par l'éther, l'eau, les acides étendus, chlorhydrique ou acétique, puis de nouveau par l'eau, l'éther et à froid par l'alcool, enfin par le chloroforme.

La bilirubine brute ainsi préparée est purifiée par broyage avec $CHCl^3$ et lavage sur filtre à succion avec ce solvant.

On la soumet encore à une nouvelle extraction au chloroforme.

Enfin elle est bouillie avec de l'alcool absolu au réfrigérant à reflux.

Ce traitement enlève la matière colorante verte qui souille souvent le pigment jaune orangé de la bile.

Dans une expérience portant sur 500 grammes de calculs de bœuf, KÜSTER a séparé 64 grammes de bilirubine brute dont 13,5 de β -bilirubine.

Il établit, en effet, une distinction, basée sur des différences de solubilité dans le chloroforme, en *bilirubines vraies* et *β -bilirubines*.

1. β -Bilirubines. — Ces substances représentent la partie la plus soluble dans le chloroforme ; elles sont amorphes, d'un vert noir à l'état solide. Elles fondent vers 60^0 et brûlent avec effervescence. Ce groupe lui-même n'est pas homogène ; en effet la solubilité varie suivant les échantillons ; dans tel cas, elle est d'une partie de matière pour 11,3 de $CHCl^3$ à 10^0 , dans tel autre, seulement de 1 partie pour 43 de $CHCl^3$ à 10^0 .

Les analyses élémentaires de ces divers produits ne sont pas concordantes.

W. KÜSTER l'explique par des différences de composition et d'une façon plus précise par la présence de chlore en quantité variable. Cet élément a été retrouvé par lui dans des proportions allant de 0,275 à 3,36 et même à 4,6 o/o.

(1) W. KÜSTER, *Zeitschrift für physiol. chem.*, 1901 et *ibid.*, 1905,

KÜSTER a montré que certains réactifs dissolvent plus aisément les produits chlorés; ce sont l'éther acétique, l'acétone bouillant, la pyridine, qui permettent ainsi de les isoler des substances non chlorées ou très pauvres en chlore.

Partant d'un mélange à 4,6 o/o de chlore on peut en séparer des produits contenant seulement 0,94 et 0,91 o/o de Cl.

Les β -bilirubines sont donc, pour KÜSTER, des produits artificiels résultant d'une chloruration plus ou moins avancée au dépens du chloroforme.

Nous ferons remarquer, à ce sujet, que la présence de Cl tient peut-être plutôt à une addition de CHCl_3 à la substance pigmentaire qu'à une décomposition de ce solvant ordinairement si stable lorsqu'il est pur et anhydre.

2. *Bilirubines*. — De même pour la bilirubine vraie la solubilité oscille dans des limites assez larges.

Exemples	1 partie de pigment exige 308 parties de CHCl_3				
	I	—	—	—	306
	I	—	—	—	157
	I	—	—	—	271

Ce savant chimiste en conclut qu'il existe plusieurs bilirubines ou plutôt plusieurs états de polymérisation du même pigment. Ces condensations moléculaires se font progressivement; la cristallisation dans la diméthylaniline permettrait de réaliser la dépolymérisation. « Les parties très difficilement solubles dans le chloroforme, après cristallisation de la diméthylaniline, c'est-à-dire après chauffage à 190° se dédoublent et donnent en partie une modification très facilement soluble mais instable ».

C'est là, bien entendu, une conception purement hypothétique.

Il est plus raisonnable d'admettre, avec KÜSTER lui-même, que ces différences ne tiennent pas seulement à la matière elle-même mais aussi peut-être à d'autres conditions; et par exemple on comprendrait qu'une solution de bilirubine traitée par du chloroforme contenant des β -bilirubines soit apte à dissoudre plus de bilirubine que le chloroforme pur.

Pour KÜSTER : « Même quand elle est pure, la bilirubine préparée par extraction avec le chloroforme contient du chlore ».

Enfin « dans les solutions chloroformiques de bilirubine pure, même dans le vide, et à l'abri de la lumière il se fait une petite quantité d'un produit vert, très soluble dans l'acide acétique ».

Telles sont les principales conclusions des remarquables travaux de W. KÜSTER. Nous réservons pour plus tard les belles recherches sur les acides hématiques, obtenus par oxydation de la bilirubine.

II. **Calculs biliaires.** — Nous avons utilisé pour nos recherches un mélange de calculs biliaires de veau et de bœuf ; la plupart ont été recueillis aux abattoirs de Paris ; un certain nombre nous a été envoyé par notre ami M. le professeur MOYANO de Saragosse, et par M. MASSON, représentant au Havre de la maison Armour de Chicago.

Autrefois très fréquents ces calculs sont devenus très rares et leur prix a augmenté d'une façon extrême (plusieurs centaines de francs le kilo, 1.250 francs, prix de la maison Swift and Co). La raison de cette rareté n'est pas d'ordre pathologique, mais plutôt d'ordre économique ; elle est en relation étroite avec l'abaissement de la durée d'exploitation des animaux de boucherie. Au lieu de conserver les bovidés mâles jusqu'à 8 et 10 ans pour les travaux agricoles et les vaches laitières jusqu'à 10 et 12 ans ; on trouve beaucoup plus avantageux de les sacrifier jeunes, dès qu'ils ont donné leur rendement maximum. Les chances d'infections biliaires sont donc diminuées d'autant : or c'est précisément chez les vieux animaux qu'on trouve le plus souvent des calculs.

Chez les bovidés adultes, les calculs sont souvent volumineux, gros comme une noisette, parfois comme un petit œuf de poule. Dans une vésicule, il n'y a le plus ordinairement qu'une concrétion. La surface est tantôt lisse, tantôt irrégulière, muriforme. La couleur est rouge-orangée, ou orangé-jaune rappelant le sulfure de cadmium, ou enfin un mélange des deux teintes.

Chez le veau, la lithiase biliaire est rare ; quand elle existe, on retrouve en même temps presque toujours des lésions du parenchyme hépatiques. La constatation de ces désordres servent d'ailleurs de précieuses indications dans ces recherches. Le volume des calculs ne dépasse pas celui d'une noix ; leur couleur est fréquemment d'un rouge orangé très chaud.

La présence de calculs dans la vésicule biliaire chez le porc est exceptionnelle ; sur 2.510 vésicules ouvertes nous avons obtenu 5 calculs analogues comme volume et comme teinte à ceux du veau.

Chez le mouton, nous n'avons pu nous en procurer ni en découvrir.

On peut également recueillir des concrétions biliaires en dehors de la vésicule, dans les canaux biliaires.

Chez le cheval, dépourvu de poche biliaire, c'est dans les conduits cystiques ou cholédoques qu'il faut les chercher. Elles sont fréquentes dans ces voies biliaires chez le bœuf et le mouton ; on les trouve groupées, tassées les unes contre les autres, ou à l'état de lamelles concentriques peu consistantes mêlées de mucus, de fibrine, de résidus cellulaires.

La présence de parasites dans le foie est la cause la plus importante de leur formation ; larves de strongle, de sclérostomes chez le cheval ; douves chez les ruminants, grande douve (*fasciola hepatica*) chez les bovidés adultes, grande et petite douve (*fasciola lanceolata*) chez le mouton.

Ces parasites agissent soit directement, leurs œufs, leurs cadavres servant d'amorce, de noyau aux dépôts pigmentaires, soit indirectement par obstruction des canaux biliaires et stagnation consécutive du liquide biliaire. En même temps ils provoquent une inflammation chronique des tuniques de ces canaux, qui aboutit souvent à une calcification partielle avec des ectasies et des rétrécissements cicatriciels. Ces altérations canaliculaires se traduisent à l'examen macroscopique par des travées blanchâtres, dures au toucher, à direction radiaire.

Il existe une relation assez intéressante entre la coloration de la bile et la présence des calculs. En effet, dans les biles

vertes, les calculs sont rares, on les rencontre surtout dans les biles jaunes ou jaune orangées. Cette remarque s'applique également à la lithiase canaliculaire.

Si on soumet ces calculs à la dessiccation, sur vide sulfurique, on constate, après un certain temps, une fragmentation progressive en petites masses, parfois même en une fine poussière jaune orangée. L'examen des fragments montre leur structure zonaire. Les calculs se forment donc comme les grains d'amidon par des dépôts successifs de matière. Les différentes couches d'opposition se reconnaissent à leur coloration différente, les unes pâles, jaunes ou jaune orangées, les autres plus foncées, orangées ou rouge orangées. Ces variations de teinte peuvent s'expliquer par une condensation plus grande suivant les zones, ou bien par l'existence de pigments de coloration différente.

Dans certains calculs on observe un arrêt du dépôt de bilirubine ; on constate, dans ces cas, l'existence de couches brunes, ou verdâtres, formées de bile concrétée.

Le centre est ordinairement de coloration brunâtre ; la matière y est peu condensée, de structure alvéolaire, avec présence fréquente de lamelles brillantes de cholestérines ou d'aiguilles d'acides gras.

L'amorce est constituée le plus souvent par des flocons fibrineux ou muco-purulents ; dans un cas très curieux, nous avons trouvé au centre d'une concrétion canaliculaire en voie de formation un cadavre de grande douve entourée d'une mince enveloppe fibrineuse.

Il n'existe pas de données certaines sur le temps de formation des calculs chez les animaux. Cependant l'existence de lithiase biliaire sur les veaux permet d'indiquer une approximation sérieuse. Chez des veaux de trois mois on peut déjà rencontrer des calculs et quelques-uns de la grosseur d'une noix. Avant deux mois, au contraire, ils sont extrêmement rares. On peut donc conclure qu'une durée d'un mois est amplement suffisante.

On admet, avec les auteurs classiques, que les pigments con-

tenus dans les calculs biliaires résultent de la transformation, en grande partie dans le foie, de l'hémoglobine provenant de la destruction au sein de l'organisme des globules sanguins trop vieux ou altérés sous des influences diverses. Cette évolution peut aussi se produire en dehors du parenchyme hépatique ; elle a lieu en particulier dans les foyers hémorragiques par un phénomène de véritable digestion dont les cellules lymphoïdes sont les agents les plus actifs.

Lithiase expérimentale. — Certaines observations nous ont conduit à concevoir au moins provisoirement un mode plus simple de transformation du pigment sanguin en pigment biliaire. Au cours de plusieurs milliers d'examen de vésicules biliaires à l'inspection des viandes aux halles centrales de Paris, nous avons observé deux exemples qui nous ont paru fort intéressants dans cet ordre d'idées.

Il s'agissait d'organes contenant au sein du liquide biliaire des masses dont le poids s'élevait jusqu'à 120 grammes et totalement recouvertes de bilirubine. Aplatie, de surface et d'épaisseur très irrégulières, par leur structure fibrineuse et leur coloration profonde, elles avaient pour origine certaine d'anciens caillots sanguins. Au point de vue pigmentaire, elles présentaient à l'examen une épaisse couche de bilirubine sur toute leur surface et leurs plissements ; dans les parties centrales, une coloration rouge foncé due à de l'hémoglobine, enfin entre les deux zones un mélange des deux pigments.

Cette coexistence intime des deux pigments pouvait sans doute s'expliquer par simple dépôt, sur un caillot sanguin jouant le rôle de corps étranger, de bilirubine normalement éliminée par la bile, mais elle pouvait aussi résulter d'une transformation de l'hémoglobine en bilirubine dans la vésicule biliaire elle-même.

En collaboration (1) avec M. MAGNE, chef des travaux de physiologie, nous avons réalisé au laboratoire de M. KAUFMANN, à l'Ecole vétérinaire d'Alfort, une première série d'ex-

(1) M. PIETTRE, *Comptes rendus*, 1909.

périences. Sur des chiens et des lapins nous avons introduit aseptiquement dans la vésicule, préalablement vidée, des volumes déterminés de sang du même animal. Les animaux opérés étaient tués au bout de six semaines à cinq mois. Voici la technique suivie dans ces expériences : L'animal est fixé sur le dos et anesthésié. On fait une incision sur la ligne blanche ; on découvre la vésicule que l'on vide par pression. On immobilise cette poche à l'aide d'une pince. Du sang est prélevé à la seringue dans une des carotides mises à nu au préalable. On l'injecte aussitôt dans la vésicule en introduisant l'aiguille très obliquement dans la paroi, de façon à ce que la perforation de la muqueuse ne soit pas en regard avec celle de la musculieuse. L'orifice de fonction se ferme de suite.

Le 18 novembre 1908, chien de 11 kg. 500. Après évacuation de la vésicule on injecte 5 centimètres cubes de sang carotidien.

L'animal est conservé, sans aucun accident, jusqu'au 11 février. On le sacrifie à cette date, c'est-à-dire trois mois après l'opération.

Dans la vésicule on constate la présence de huit petit caillots brunâtres qui, rapidement lavés à l'eau distillée, sont séchés dans le vide. L'ensemble pèse 0 gr. 067.

28 janvier 1909, chienne de 10 kg. 800. On injecte 15 centimètres cubes de sang carotidien dans la vésicule. Sacrifiée le 2 mai il ne reste aucune trace de l'injection, aucun résidu.

28 janvier 1908, chien de 16 kg. 500. Injection de 18 centimètres cubes de sang artériel ; il succombe le 29 juillet au cours d'une autre expérience. Dans la poche biliaire, absence de caillots, mais, en revanche, présence de petites granulations orangées analogues à un sable fin. Examiné au microscope ce dépôt est formé d'amas de cristaux classiques de bilirubine.

20 novembre 1909, lapin de 2 kg. 400. Reçoit 2 centimètres cubes de sang dans la vésicule ; chez le lapin l'injection offre de grandes difficultés à cause du peu d'épaisseur des parois de la membrane vésiculaire.

L'animal est tué le 6 décembre. On trouve cinq petits caillots bruns qui, après dessiccation, pèsent 0 gr. 292.

Ces différents calculs artificiels ont été étudiés au point de vue pigmentaire.

Après pulvérisation ils étaient épuisés avec du chloroforme bouillant ; la présence de bilirubine libre dans ces conditions se traduit par une coloration orangée du solvant dont l'évaporation abandonne des cristaux typiques.

Seuls les calculs isolés chez le chien contenaient de la bilirubine. Ceux de lapins n'en renfermaient aucune trace.

En dehors des points qui intéressent la technique des injections intravésiculaires ainsi que des notions sur la coagulation du sang en présence de bile, et la durée de ces caillots artificiels, nous n'avons pu tirer de ces expériences des conclusions bien fermes. Sans doute, en effet, chez le chien l'existence de ces caillots s'accompagne de la présence de bilirubine, mais cela peut s'expliquer par ce fait que normalement la bile de cet animal élimine de petites quantités de pigment qui se dépose volontiers sur les corps étrangers présents.

Cette interprétation acquiert quelque valeur de ce fait que chez le lapin dont la bile ne contient pas normalement de bilirubine les calculs artificiels en sont dépourvus.

La question reste donc posée et demande de nouvelles recherches.

III. Traitement chimique des calculs. — Nous allons exposer les principaux points de notre technique.

Les calculs biliaires recueillis sont aussitôt lavés pour éliminer la bile qui les souille, puis séchés. On élimine ceux qui sont riches en matières pigmentaires brunâtres ou verdâtres.

Les autres sont réduits en poudre très fine, tamisée puis soumise à l'action de l'acide chlorhydrique à 10 o/o au bain-marie. On agite fréquemment le mélange; après une demi-heure de contact on décante la liqueur légèrement trouble qui possède une coloration brunâtre et répand une forte odeur d'hydrogène sulfuré.

On renouvelle cinq à six fois la solution acide, on lave à neutralité la poudre qui est séchée à l'étuve à 40°. Brune tant qu'elle est humide, elle devient rouge brique par dessiccation.

KÜSTER après avoir employé l'acide chlorhydrique, recommande l'acide acétique; d'après lui HCl favoriserait la production de biliprasine, produit artificiel, aux dépens de la bilirubine.

En effet, tandis que dans une expérience portant sur 250 grammes de calculs biliaires il n'obtenait avec HCl que 38 gr. 5 de bilirubine, c'est-à-dire 14 o/o, l'emploi d'acide acétique lui permet de préparer avec le même poids de matière première 67 grammes de pigment, soit 24,3 o/o en trois extractions :

6 o/o dans la première,

9 » dans la seconde,

2,7 » dans la troisième.

Des essais faits exactement dans les mêmes conditions avec les deux acides, nous ont donné des résultats sensiblement les mêmes.

Dans notre procédé, l'extract chlorhydrique aqueux s'élève à 18 o/o environ.

La matière séchée à l'étuve à 40°, broyée à nouveau est introduite dans un soxhlet puis soumise à une série de solvants, dans une chambre noire, comme le conseillent ORNDORP et TEEPLE.

On commence l'épuisement par l'éther qui enlève les matières grasses, cholestérines, et acides gras; l'opération est achevée dès que l'éther ne dissout plus rien d'appréciable, il se colore à ce moment en jaune safran par solubilisation de traces de bilirubine.

A l'éther on substitue l'alcool méthylique qui dissout une matière colorante d'un beau vert émeraude.

Enfin on épuise au chloroforme rendu anhydre et neutre par agitation sur le carbonate de potasse fondu et sec et distillation.

Le traitement chloroformique des calculs biliaires doit être surveillé avec soin pendant toute sa durée.

Si, en effet, on fait agir le chloroforme aussi longtemps qu'il entraîne de matières solubles, on obtient un mélange de plusieurs substances dont la séparation est extrêmement pénible. Pour y parvenir, il faut alors recourir à une nouvelle extraction qui occasionne des pertes importantes, et peut introduire des impuretés dues au solvant lui-même. Ce dernier.

point a été particulièrement mis en lumière par W. KÜSTER qui le premier a reconnu que le contact répété et prolongé s'accompagne d'une fixation, sur la molécule pigmentaire, de chlore provenant, selon lui, d'une décomposition du chloroforme, mais dont nous avons plus haut expliqué la présence d'une tout autre façon. Il est donc très important, pour éviter ce grave écueil, de séparer au fur et à mesure de leur dissolution les pigments qui passent dans le chloroforme.

Le fractionnement des extraits chloroformiques permet de constater l'existence de plusieurs portions solubles dans le solvant. On n'obtient pas évidemment du premier coup une séparation absolue; d'ailleurs il n'existe très certainement pas de parois étanches entre les différentes portions pigmentaires, au point de vue de la solubilité; mais on parvient à une première approximation toujours perfectible.

L'application de cette méthode nous a permis de réaliser les séparations suivantes ;

Le chloroforme dissout d'abord abondamment une matière jaune-brun, très soluble. L'extraction se fait avec grande rapidité relativement aux autres pigments; on juge qu'elle est terminée de deux façons; 1^o on constate dans le soxhlet et surtout dans les branches du siphon le changement de coloration qui passe du jaune-brun au rouge-orangé; 2^o si on fait un prélèvement à ce moment et qu'on l'évapore au bain-marie il reste un résidu orangé à peine brunâtre. On sépare avec soin la solution chloroformique contenue dans le ballon du soxhlet, et après rinçage de l'appareil on reprend l'extraction avec une nouvelle quantité de solvant.

Ce deuxième traitement demande un temps plus long. Dans le chloroforme passe une substance rouge-orangé, qui se dépose après sursaturation du solvant, sous forme de fin précipité ou de croûtes.

Lorsque le chloroforme se colore franchement en jaune safran, on cesse l'extraction.

On procède à un troisième épuisement qui est extrêmement long; chaque siphonage entraîne, en effet, une faible quan-

tité de pigment. De coloration safranée au début, la liqueur d'extraction devient jaune très pâle.

Le traitement achevé il reste dans le soxhlet un résidu d'environ 40 o/o, grenu, de coloration brunâtre, contenant encore des matières pigmentaires, et qu'il n'est pas avantageux de reprendre seul.

Les pigments solubles dans le chloroforme sont donc séparés en trois portions : une portion très soluble qui paraît correspondre aux β -bilirubines de KÜSTER, une seconde moins soluble, de coloration rouge-orangée, enfin une troisième jaune de chrome ; le mélange de ces deux derniers que nous sommes parvenus à isoler forme ce que l'on appelle jusqu'ici la bilirubine.

Avant d'aborder l'étude détaillée de ces substances colorantes, nous exposerons le bilan de deux expériences sur le traitement des calculs biliaires.

EXEMPLES EXPÉRIMENTAUX

1. On part de 100 grammes de calculs de bœuf; après pulvérisation, suivie de tamisage, on les introduit dans un ballon contenant 500 centimètres cubes d'une solution d'HCl à 10 o/o. On porte au bain-marie et on agite fréquemment. La liqueur prend une coloration brun sale et répand une forte odeur sulfurée.

Après une demi-heure de chauffe au bain marie, on laisse reposer, on décante puis on renouvelle cinq ou six fois la solution acide dans les mêmes conditions.

La matière est recueillie, lavée à neutralité et séchée à l'étuve à 400.

Elle possède sèche une belle coloration orangée, son poids est de 84 grammes; il y a donc 16 o/o de perte, représentée par l'extrait aqueux chlorhydrique.

On la soumet alors dans un soxhlet, à l'abri de la lumière, à la série des solvants, éther, alcool méthylique et chloroforme.

L'épuisement éthéré est prolongé pendant 30 heures et donne une liqueur brunâtre. Dans les dernières heures le solvant se colore en jaune clair. Poids de l'extrait = 7 grammes.

Le traitement par l'alcool méthylique exige 21 heures environ. La matière colorante verte est dissoute. Poids de l'extrait = 2 gr. 25.

Le chloroforme enlève en quelques heures (10 heures) le pigment rouge-brun, $P = 1,6$; puis en 75 heures le pigment rouge-orangé, $P = 8$ grammes, et la substance jaune safranée en 95 heures, $P = 13,5$,

Poids du résidu dans le soxhlet = 55 grammes de matière jaune brunâtre,

2. 250 grammes de calculs sont mis en œuvre.

Après pulvérisation la poudre est épuisée au bain-marie en cinq fois par trois litres de solution chlorhydrique à 10 o/o.

La poudre lavée et séchée pèse 205 grammes ; la perte est donc de 45 grammes, poids des substances dissoutes en solution acide.

Durée de l'extrait éthéré, 36 heures. Poids = 18 grammes.

Extrait par l'alcool méthylique, 25 heures. P = 8,5.

L'épuisement par le chloroforme est très long.

Les matières rouge-brun, très solubles, sont enlevées en 19 heures ; leur poids est de 3 grammes.

On fait agir ce solvant pendant 82 heures pour dissoudre les pigments rouge orangé qui pèsent 14 grammes.

Enfin il faut environ 98 heures pour achever l'épuisement. Poids de l'extrait jaune-safran obtenu = 26.

L'insoluble resté dans l'appareil est de 125 grammes ; il est encore fortement coloré en rouge orangé ; l'action de l'acide chlorhydrique a donc été insuffisante.

Bilan de ces deux traitements

100 grammes de calculs biliaires donnent	{	Extrait acide (HCl) aqueux	17
		— éthéré	7
		— alcoolique (alcool méthylique) . . .	2,7
		— chloroformique (1 ^{er} épuisement) . . .	1,5
		— — (2 ^e —)	8
		— — (3 ^e —)	12
		Résidu	52

IV. Etude des produits d'extraction. — 1. *Extrait éthéré.* —

Aucune recherche spéciale n'a été faite sur cette partie. Nous avons simplement constaté la présence d'acides gras et de cholestérines par cristallisation et reprise à l'alcool méthylique sur filtre à succion. Les cholestérines moins solubles sont en partie séparées.

2. *Extrait méthylique.* — Belle liqueur vert-émeraude. Après distillation de l'alcool il reste une substance vert foncé, insoluble dans l'éther, le chloroforme. Au spectroscope, la matière colorante est caractérisée par la présence d'une forte bande dans le rouge, $\lambda = 638$.

C'est un produit que nous croyons totalement artificiel, dû à l'action de l'acide chlorhydrique, en présence d'alcool, sur

les pigments orangés. Il ne paraît pas, en effet, exister avant l'intervention de ce réactif; des calculs épuisés directement à l'alcool méthylique ne nous ont pas permis d'obtenir ce pigment vert.

Il contient des traces de Cl et de soufre.

La recherche de ces éléments a été faite par la méthode de CARIUS en présence de nitrate d'argent.

I. Matière = 0,5205	Cl = 0,007
	Cl o/o = 1,43
II. Matière = 0,6105	Cl = 0,009
	Cl o/o = 1,51

Le soufre précipité à l'état de SO^4Ba n'a pu être pesé à cause de son faible poids.

Les conditions de préparation, les caractères de solubilité permettent de l'identifier à la *biliprasine* de STÖDLER.

Cet auteur assignait à ce pigment la formule $\text{C}^{16}\text{H}^3\text{N}^2\text{O}^6$ sans tenir compte du Cl et du S dont il n'avait pas constaté la présence.

W. KÜSTER signale à son tour l'existence d'un autre pigment vert, la « *choléprasine* », qui serait un produit naturel, existant normalement dans les calculs biliaires du bœuf.

Il l'a obtenu pour la première fois en traitant par l'acide acétique, la poudre de ces calculs, après épuisement au chloroforme. Pour le purifier il le fait bouillir avec l'acide acétique concentré et le laisse digérer quelque temps. La solution s'éclaircit, on filtre et lave avec l'acide acétique chaud tant qu'il se colore en vert. L'acide acétique est alors distillé dans le vide, le résidu repris avec beaucoup d'eau est additionné de petites quantités d'ammoniac. La précipitation n'est pas complète. On recueille le précipité, on le dissout dans un alcali dilué; après filtration on le reprécipite par l'acide acétique, on le lave et le sèche. Dès qu'il est sec, sa solubilité est très faible dans l'acide acétique.

Tout récemment, ce même savant a repris ses recherches en collaboration avec NIETHAMER suivant une nouvelle technique qu'il suppose devoir lui donner la *choléprasine* pure.

500 grammes de calculs biliaires sont pulvérisés finement et séchés. On les épuise d'abord avec de l'éther puis avec de l'eau chaude, enfin avec de l'acide acétique à 10 o/o. On lave à l'eau jusqu'à neutralité, on sèche et on épuise par l'éther pendant une journée et demie. On traite à l'alcool à 96° à froid quelques semaines en agitant de temps en temps. L'alcool dissout un pigment vert. On sèche à nouveau et on épuise à chaud avec l'acide acétique qui enlève abondamment un autre pigment vert, la choleprasine.

Pour KÜSTER, ce pigment est différent de la biliverdine et aussi de la biliprasine.

Les différences les plus importantes reposent sur les caractères de solubilité et la teneur en soufre.

La choléprasine est soluble dans l'acide acétique mais insoluble dans l'alcool dans lequel sont solubles la biliverdine et la biliprasine.

Elle contient du soufre de 1,06 jusqu'à 1,62 o/o.

KÜSTER ne donne aucune analyse de ce produit.

Malgré l'autorité de ce savant il nous paraît difficile d'admettre, sans d'autres données, l'existence de cette matière comme pigment naturel de la bile.

3. *Extraits chloroformiques*. A. *pigment orangé-brun*. — Ce pigment, dissous dans le chloroformè, donne en solution concentrée, une liqueur presque brune, en solution étendue, une belle coloration orangé brun.

Par évaporation de son solvant à l'abri de l'humidité et de la lumière il se dépose sous forme de lamelles pailletées, de couleur mordorée avec légère teinte verdâtre rappelant la fuchsine.

Il est extrêmement soluble dans le chloroforme, déjà au contact de ses vapeurs il perd son brillant et très vite fond en une liqueur huileuse.

Ce caractère très important permet à lui seul de le différencier de la bilifuscine de STÖDLER, dont la solubilité est très faible.

Les solutions chloroformiques examinées au spectroscope possèdent quatre bandes d'absorption :

$$\begin{array}{lcl} \lambda = 638 & \} & \text{très accentuées.} \\ \lambda = 589 & \} & \\ \lambda = 559 & \} & \text{assez faibles.} \\ \lambda = 517 & \} & \end{array}$$

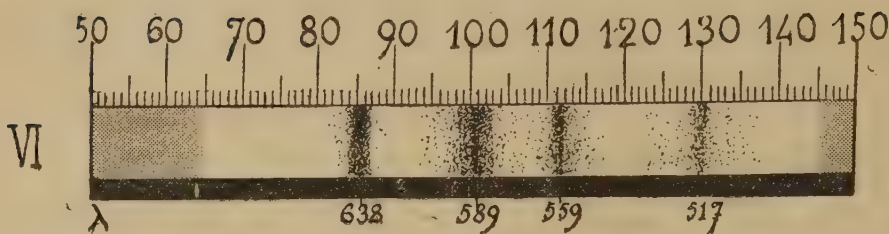


Fig. 5.

Cette substance pigmentaire possède bien une existence réelle ; on l'isole des calculs biliaires comme nous venons de le voir. C'est elle également qui constitue la coloration brune si fréquente dans les biles d'homme, de chien, de mouton.

En outre son spectre est très voisin de celui de ces biles ; et c'est vraisemblablement à sa présence qu'elles doivent en partie leur spectre.

Etant donnée la faible quantité de matière que nous avons eu en mains nous n'avons pu encore en faire l'analyse, ni rechercher la présence de chlore et de soufre.

Le rendement est en général très peu élevé, de 1 à 3 grammes pour 100 ; il est variable avec la nature des calculs. Très faible lorsqu'on n'utilise que les calculs très purs, de coloration orangée ou jaune ; il devient plus important lorsqu'on choisit de préférence des calculs bruns, ou même d'un noir brillant avec léger reflet verdâtre très analogue à la substance pigmentaire en question.

Il paraît correspondre au β -bilirubines de KÜSTER ; mais le fait de son existence dans les calculs le différencie déjà de ces dernières qui sont des produits artificiels.

D'autre part son mode de préparation comporte une seule

extraction au chloroforme, alors que les β -bilirubines subissent plusieurs passages par ce solvant. Les chances de chloruration, de quelque nature qu'elles soient, sont donc moins nombreuses.

La séparation d'avec les pigments orangés s'obtient aisément grâce à sa grande solubilité dans le chloroforme.

B. *Pigments rouge-orangé et jaune.* — Nous avons vu qu'en fractionnant l'extraction chloroformique on parvient à séparer ces deux matières colorantes.

Quelles relations entretiennent entre eux ces deux pigments ?

Tout d'abord ils correspondent à des calculs de même coloration ; il y a, en effet, des calculs jaunes très pâles, d'autres rouge-orangés. En général chez le bœuf les calculs jaunes sont les plus fréquents, ainsi que chez l'éléphant (M. ALBERTO PAZ nous en a envoyé plusieurs échantillons de Mendoza, République Argentine) ; chez le veau, le chien, le porc, ils sont surtout orangés.

Le plus grand nombre possède des teintes intermédiaires, mélanges de jaune et d'orangé, répartis par zones concentriques plus ou moins régulières.

Dans le traitement des calculs biliaires on a donc affaire à ces deux pigments au moins.

Le produit moyen isolé dans une seule extraction portait le nom de « bilirubine » et était considéré comme une véritable entité chimique par les classiques.

Les premiers savants qui ont émis la théorie de la pluralité des « bilirubines » et plus spécialement WILLIAMS KÜSTER, ont basé cette conception uniquement sur des différences de solubilité et de teneur en azote. Mais d'autre part KÜSTER a démontré que les différentes portions de bilirubine contenaient des quantités variables de chlore provenant de la décomposition du chloroforme employé aux extractions et aux purifications.

Il en résulte donc que cette notion de pluralité perd par cela même une partie de sa valeur, la présence de Cl pouvant suffire à expliquer ces variations de solubilité car « la pré-

sence de bilirubine chlorée, c'est-à-dire de β -bilirubine, permet de dissoudre plus de pigment que le chloroforme pur » KÜSTER.

En étudiant les deux pigments séparés par fractionnement nous indiquerons les résultats obtenus au point de vue de la présence du chlore.

b. *Bilirubine*. — Le produit le plus soluble dans le chloroforme correspond à la notion qu'on a de la bilirubine ; c'est une matière d'un rouge orangé foncé, bien cristallisée en tables rectangulaires.

La solubilité a été faite à froid et à chaud.

A froid (15°). — Dans une fiole de 300 centimètres cubes on introduit 0 gr. 524 de substance colorée, bien pulvérisée, puis on ajoute 150 centimètres cubes de chloroforme pur et sec. On bouche et on agite à plusieurs reprises pendant deux heures. On filtre exactement 100 centimètres cubes qu'on met à évaporer dans un vase taré, à l'abri de la lumière.

Le résidu pèse 0,0749 et dans une deuxième expérience 0,0803.

La solubilité moyenne est donc de 0,0776 pour 100 à 15° .

A chaud. — On chauffe à l'ébullition, au réfrigérant à reflux, 150 centimètres cubes de CHCl_3 auxquels on a ajouté 0,725 de pigment. Après 30 minutes de contact on filtre bouillant 100 centimètres cubes que l'on évapore à sec dans les mêmes conditions que plus haut.

Le résidu sec pèse dans un cas 0,137

Et dans un autre 0,146

La solubilité moyenne est donc de 0,141 pour cent à l'ébullition.

La recherche de l'azote a été faite par la méthode de KJELDAHL.

Dosage d'azote

I. Matière = 0,5226 Az = 0,049

Az 0/0 = 9,36

II. Matière = 0,4042

Az = 0,0378

Az 0/0 = 9,35.

Recherche du chlore par la méthode de CARIUS :

Dosage du Cl

I. Matière = 0,4782	AgCl pesé = 0,0192
	Cl = 0,004
	Cl o/o = 0,991
II. Matière = 0,5801	AgCl pesé = 0,0174
	Cl = 0,0043
	Cl o/o = 0,741

Le Cl, étant donné sa très faible proportion, moins de 1 o/o, constitue donc seulement une impureté négligeable.

b'. *Biliflavine*.— C'est le produit le moins soluble, il possède une belle coloration jaune de chrome et cristallise en petites tables très minces, parfois même les extrémités de ces tables sont arrondies.

Solubilité à froid (15°).

100 centimètres cubes de chloroforme dissolvent 0 gr. 0648 de matières ;

100 centimètres cubes de chloroforme dissolvent 0 gr. 0704 de matière, c'est-à-dire 0,0676 en moyenne.

Solubilité à chaud (ébullition).

100 centimètres cubes de chloroforme dissolvent 0,126

» » » et 0,118

c'est-à-dire 0 gr. 122 en moyenne.

Azote par la méthode de KJELDAHL.

Dosage

I. Matière = 0,4282	Az = 0,0420
	Az o/o = 9,8
II. Matière = 0,4903	Az = 0,0476
	Az o/o = 9,7

La recherche du chlore faite par la méthode de CARIUS sur deux échantillons de matière (0,4548 et 0,5669) nous ont donné des résultats négatifs.

Telles sont les propriétés principales des deux fractions pigmentaires ; leurs différences, sans être trop absolues, permettent cependant d'établir une distinction nécessaire.

Nous proposons de conserver à la première substance rouge-orangée, plus soluble, moins riche en azote, le nom de

bilirubine, et de donner à la seconde, jaune de chrome, moins soluble mais plus riche en azote, le nom de « *biliflavine* », déjà employé dans la nomenclature chimie-physiologique mais sans désignation bien fixe.

Nous avons vu que c'est grâce au changement de coloration des matières séparées par le fonctionnement chloroformique que nous avons été conduits à l'étude à peine ébauchée encore de chacune d'elles.

Il nous reste à examiner quelle influence le chloroforme exerce sur la bilirubine et la biliflavine.

W. KÜSTER admet, nous l'avons vu, que ce solvant a une action importante sur la bilirubine ; en se « décomposant il fixerait du Cl en plus ou moins grande quantité de 0,275 à 4,6 o/o ». Les portions les plus chlorées deviennent les β -bilirubines, les moins chlorées représentent les bilirubines.

Pour nous, l'action du chloroforme pur et anhydre sur les matières colorantes biliaires est moins considérable.

Mettant hors de cause le pigment orange-brun très soluble, qui est une substance bien spéciale, nous avons constaté qu'à lui seul, le solvant s'il est capable de modifier légèrement la coloration de la bilirubine et de la biliflavine, ne cède que des traces de chlore, au-dessous de 1 o/o.

Si l'on évapore, à l'abri de l'humidité et de la lumière, des solutions faites à froid de ces deux pigments dans le chloroforme, le résidu obtenu a conservé à peu près la coloration de la matière primitive. On note cependant une légère transformation du jaune en rouge orangé.

Au contraire, en présence de certains agents chimiques ou physiques, les modifications sont plus profondes.

A la lumière la matière brunit quelque peu, mais sans donner toujours de substance verte comme l'indique KÜSTER.

En présence d'eau ou de vapeur d'eau, même altération de faible importance.

L'addition d'HCl très étendu à une solution chloroformique de bilirubine ou de biliflavine donne un résidu rouge-brun avec une coloration verte diffuse. Par épuisement avec les

alcools éthylique ou méthylique on enlève cette matière à l'état de magnifique liqueur vert émeraude.

Une plus grande concentration en acide chlorhydrique augmente la transformation en vert; de plus le reste rouge-brun est devenu beaucoup plus soluble dans le chloroforme.

En outre des solvants classiques des pigments biliaires rouge-orangés ou jaunes : chloroforme, diméthylaniline (KÜSTER), nous avons employé avec succès le chlorure de benzyl ($C^6H^5CH^2Cl$) et un mélange de tétrachlorure de carbone et de chloroforme.

Dans le chlorure de benzyl, les bilirubines se dissolvent abondamment à chaud, puis cristallisent par refroidissement. Il se forme lentement dans le solvant un précipité brunâtre assez lourd qui, examiné au microscope, se trouve formé d'aiguilles d'un rouge rubis, groupées en étoile et agissant très activement sur la lumière polarisée.

Le mélange tétrachlorure de carbone-chloroforme est fait dans les proportions de 1 de CCl^4 pour 2 de $CHCl^3$. Le pigment y est peu soluble même à l'ébullition; l'évaporation rendue plus lente par le CCl^4 permet d'obtenir de larges tables carrées mais peu épaisses.

L'analyse élémentaire a été pratiquée sur les deux pigments rouge-orangé et jaune non séparés.

Combustion

I. Matière = 0,3386		Acide carbonique = 0,8243
		Eau = 0,1818
II. Matière = 0,2845		Acide carbonique = 0,4958
		Eau = 0,1498

Dosage d'azote (méthode de KJELDAHL)

I. Matière = 0,5340	Az = 0,0504
	Az o/o = 9,45
II. Matière = 0,7281	Az = 0,0695
	Az o/o = 9,54

soit en centièmes :

C = 66,5
H = 5,95
N = 9,5

CHAPITRE II

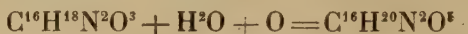
RELATIONS ENTRE LES PIGMENTS ORANGÉS ET LES PIGMENTS VERTS DE LA BILE

Les pigments orangés sont considérés, à juste titre, comme les pigments les plus importants de la bile et sans doute aussi comme l'origine de tous les autres.

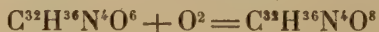
Ce sont eux également qui sont les mieux connus et qui présentent par suite de leur cristallisation facile les garanties les plus solides de pureté.

C'est deux que nous partirons pour étudier les pigments verts de la bile.

Jusqu'à présent la biliverdine a été considérée soit comme un produit d'oxydation et d'hydratation de la bilirubine classique d'après l'équation de STEDLER :



soit comme un simple dérivé d'oxydation (MALY).



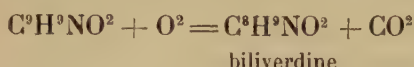
Cette dernière, la seule admise, n'a pas reçu l'appui suffisamment rigoureux de l'analyse.

Elle paraît d'ailleurs traduire, sous forme de chiffres, les circonstances dans lesquelles est obtenue la transformation d'un pigment dans l'autre, qui sont, en effet, des conditions d'oxydation plutôt que d'exprimer une réaction chimique réelle.

L'analyse élémentaire est une méthode générale qui comporte seulement des approximations plus ou moins serrées ; elle devient très délicate lorsqu'il s'agit de substances de

poids moléculaire élevé (P M. = 320 ou 640 dans le cas de la biliverdine); d'autre part le calcul de l'oxygène repose sur une différence, et ne peut avoir la certitude des autres éléments hydrogène, carbone, azote.

THUDICHUM a étudié la question de plus près; d'après lui, la bilirubine en s'oxydant donnerait naissance à un volume d'acide carbonique égal au volume d'oxygène absorbé d'après l'équation :



mais ce n'est là qu'une hypothèse, et l'auteur n'a fourni aucune démonstration expérimentale.

I. — Nous allons exposer brièvement une longue série de recherches sur les réactions de transformation du pigment orangé de la bile en matières colorantes vertes.

Sans les ranger en une classification systématique, nous en ferons deux groupes principaux; les réactions en milieu alcalin et les réactions en milieu acide. Nous ne croyons pas, en effet, que l'oxydation s'il y a oxydation, soit le seul mode de verdissement des pigments orangés.

Les unes sont classiques, nous leur donnerons, l'interprétation qui nous paraîtra la plus logique, les autres sont nouvelles et recevront les développements nécessaires.

1. *Oxydants*. — L'emploi des oxydants (bioxyde de sodium, peroxyde de zinc, eau oxygénée pure) nous a donné des résultats très médiocres.

Si dans une solution alcaline de bilirubine on ajoute peu à peu de petites quantités de bioxyde de sodium on n'obtient à froid aucune coloration verdâtre; à chaud, il se produit au contraire une décoloration totale.

MM. HUGOUNENQ et DOYON (1) ont basé un mode de préparation de la biliverdine sur l'emploi de Na^2O^2 d'après la technique suivante : on mélange la poudre de bilirubine sèche

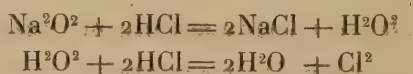
(1) HUGOUNENQ et DOYON, *Archiv. de physiolog.* [5] VIII, p. 525.

avec une petite quantité de bioxyde de sodium. On ajoute goutte à goutte de l'eau, puis de l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à saturation complète. Le mélange fonce peu à peu en couleur ; on verse encore HCl jusqu'à l'apparition de la coloration vert franc. A ce moment le magma est jeté sur un filtre et on lave jusqu'à neutralité.

Le pigment est alors repris par l'alcool absolu qui par évaporation, abandonne de la biliverdine pure.

Nous ferons remarquer tout d'abord que la transformation est rarement complète, sur le filtre une quantité appréciable de pigment reste à l'état de bilirubine ; en outre l'alcool absolu entraîne toujours une petite quantité de matière orangée en même temps que de pigment vert.

Nous insisterons surtout sur ce fait que la réaction a lieu dans des conditions très spéciales : ce n'est pas le bioxyde de sodium seul qui agit, la présence d'acide chlorhydrique est absolument nécessaire. Mais alors il se produit des réactions secondaires entre l'acide et le bioxyde, mettant en liberté de l'eau oxygénée, qui elle-même brûle un certain poids d'hydrogène de HCl ; le Cl correspondant devient disponible et peut agir pour son propre compte sur la substance. Ce sont les deux équations possibles :



Ce phénomène, de simple qu'il paraît, devient ainsi fort complexe et demande une étude plus complète.

De même que le bioxyde de sodium, le peroxyde de zinc ne provoque aucune modification à froid et une décoloration partielle ou totale à chaud.

Au sujet de l'eau oxygénée il y a une réserve importante à faire. Lorsqu'on emploie l'eau oxygénée impure du commerce on obtient assez généralement à chaud un verdissement du bilirubinate alcalin en solution aqueuse.

Cette transformation s'explique comme plus haut par la présence de petites quantités de chlorures ou d'HCl qui en

présence de réactif oxydant libèrent du Cl qui alors agit sur le pigment orangé.

Au contraire l'eau oxygénée pure, distillée dans le vide, ne provoque pas autre chose qu'une décoloration.

En ce qui concerne l'action du bioxyde de plomb, MALY (1) a sans doute montré qu'en chauffant le bilirubinate alcalin en présence de PbO^2 jusqu'à ce que la liqueur commence à verdir par addition d'acide acétique, on obtient un précipité de pigment vert, mais il n'a pas élucidé le mécanisme intime de cette réaction. KÜSTER (2) qui a repris ce point particulier écrit qu'il « n'est pas certain si les produits verts préparés par MALY ont été obtenus avec l'oxygène seul ou par PbO^2 ».

Il ajoute qu'il doit se produire en même temps qu'une oxydation une hydrolyse comme le supposait déjà STEDELER.

2. *Action des alcalis en solutions aqueuses.* — A froid, les solutions potassiques ou sodiques de bilirubine changent insensiblement de teinte; après quelques heures de contact elles acquièrent une légère coloration brun verdâtre.

En liqueur ammoniacale, la modification est très faible.

L'addition d'acides minéraux étendus, en particulier d'hydracides (HF, HCl, HBr, HI) produit dans les solutions alcalines des variations intéressantes :

Lorsqu'on neutralise les liqueurs aussitôt leur préparation achevée, l'acide provoque la précipitation de la bilirubine sous l'aspect de gros flocons couleur rouille.

Si on fait cette neutralisation un peu plus tard, mais cependant avant qu'il n'y ait eu début de verdissement de la liqueur alcaline, le précipité pigmentaire a déjà changé de teinte, il présente une légère coloration verdâtre.

Enfin, après verdissement manifeste, l'addition d'acide précipite une substance floconneuse d'un bleu clair qui passe bientôt au vert foncé. Autour de chaque goutte d'acide se forme une zone bleuâtre, puis un précipité de même teinte,

(1) MALY, *Ann. der chem. u. Pharm.*, t. CLXXV, p. 76.

(2) KÜSTER, *Zeitschrift für physiolog. chem.*, p. 314, 1898.

et après quelques instants de contact le verdissement a lieu dans toute la masse.

Nous avons suivi au spectroscopie, pas à pas, les modifications de couleur provoquées sous l'influence des acides.

Les solutions alcalines fraîches ne possèdent aucune bande dans la partie visible du spectre.

Il en est de même des solutions alcalines devenues vertes.

Au contraire, le précipité vert dissous, après lavage et dessiccation, dans l'alcool méthylique ou l'acide acétique concentré, possède une forte bande d'absorption dans le rouge, dont l'axe coïncide avec le numéro 70 de la graduation micrométrique.

Le changement de coloration se manifeste donc également par un phénomène optique très net.

En poussant plus loin ces expériences, nous avons pu faire d'intéressantes observations :

Si dans la solution alcoolique de pigment vert possédant la bande $\lambda =$ on ajoute de l'alcali ; cette bande disparaît en même temps que la couleur verte passe à l'orangé clair, c'est-à-dire à la coloration primitive de la bilirubine.

De nouveau, l'addition d'acide ramène le verdissement, etc. On obtient ainsi par le jeu des acides et des bases les successions de substance orangée sans bande et de substance verte avec bande optique. On est tenté de voir dans ces phénomènes des analogies frappantes avec les réactions colorées des phénols de la série aromatique.

Nous avons vu que le changement de coloration de la solution alcaline aqueuse de bilirubine se fait d'une façon progressive.

MM. DASTRE et FLORESCO ont bien précisé les conditions de ce phénomène, et en particulier l'influence de l'oxygène.

Nous avons repris l'étude de ce point particulier.

Sur la cuve à mercure on introduit dans une éprouvette de 200 centimètres cubes, 50 centimètres cubes d'eau complètement privée de gaz par ébullition dans le vide. Puis on prépare de petites ampoules en verre mince de 5 à 8 centimètres

cubes que l'on remplit d'une solution alcaline, faite au moment même, de bilirubine cristallisée. On réalise le vide parfait dans ces ampoules en s'aidant de la chaleur et on les scelle à la lampe en évitant de chauffer trop près de la liqueur. Une ou plusieurs de ces ampoules sont introduites sous mercure dans l'éprouvette. Elles sont entraînées et viennent flotter dans la couche aqueuse; il suffit alors de les briser à l'aide d'une épaisse tige de verre. On obtient ainsi une solution de bilirubinate alcalin dans une atmosphère totalement privée d'oxygène. Cinq éprouvettes ont été préparées dans ces conditions et conservées sur la cuve à mercure, exposées à un éclairage moyen.

Nous avons constaté qu'après 5, 8 et 10 jours de contact, aucune de ces solutions n'avait subi de modification de coloration. Sur chacune d'elles nous avons alors fait agir des solutions aqueuses d'HCl préparées à l'abri de l'air en recevant du gaz chlorhydrique, séché sur chlorure de calcium, dans de petites éprouvettes contenant de l'eau sans gaz.

Or, dans tous les cas, l'addition d'HCl a provoqué la précipitation de flocons orangés ou ocres, sans verdissement immédiat ou éloigné. Ces expériences démontrent, par voie indirecte, le rôle de l'oxygène dans ces phénomènes.

3. *Action des alcalis en solutions alcooliques.* — L'action à froid des alcalis en solution alcoolique sur la bilirubine est la même qu'en solution aqueuse, mais beaucoup moins énergique. Cela tient à la rapide évaporation des alcools et de l'alcali lui-même dans le cas de l'ammoniac.

A chaud, cependant, le verdissement est obtenu assez vite et cela même dans une atmosphère très pauvre en oxygène.

En effet, si l'on chauffe à l'ébullition, après avoir fait le vide et en continuant l'aspiration pendant la chauffe, une solution de bilirubine dans l'alcool sodé ou potassé, on constate qu'après 10 à 20 minutes la solution orangée vire brusquement au vert-émeraude.

Mais dans cette expérience il se produit, en même temps, une attaque profonde de la molécule pigmentaire, puisque,

comme nous le verrons, il y a mise en liberté de chaînes grasses.

4. *Action de composés organiques à fonctions phénoliques ou quinoniques.* — Les uns sont des réducteurs : pyrocatéchine, hydroquinone ; les autres : chlorannile et surtout benzoquinone sont des oxydants indirects qui agissent par déshydrogénation.

Les premiers ajoutés aux solutions alcalines de bilirubine en produisent lentement le verdissement.

Les seconds sont très actifs.

L'emploi de la quinone est fort intéressant. Il nous a fourni le moyen le plus sûr et le plus rapide de préparer le pigment vert. On fait séparément une solution alcaline de bilirubine et une solution très faible de quinone dans l'eau distillée. Quand elles sont tièdes, on verse goutte à goutte dans la première la liqueur quinonique en agitant. On laisse au bain-marie quelques instants, on filtre et on acidifie avec de l'acide chlorhydrique étendu. Le pigment vert précipité en larges flocons que l'on recueille, filtre, lave et sèche.

II. Telles sont les réactions des milieux alcalins sur la bilirubine. Nous allons étudier l'influence des acides au même point de vue de la transformation de ce pigment fondamental de la bile en matières colorantes vertes.

1. Les halogènes (Cl, Br, I) en solution chloroformique (MALY, THUDICHUM) ou alcoolique (A. JOLLES, BIERRY et RANC)(1), agissent sur la bilirubine dissoute dans le chloroforme et donnent de belles colorations vertes, vert-bleuâtres. Nous obtenons les mêmes réactions en ajoutant les halogènes à des solutions alcooliques sodées de pigment ; dans ces conditions on peut engager beaucoup plus de matière qu'en utilisant le chloroforme comme solvant de la bilirubine. Dès que le sodium est neutralisé l'halogène agit sur le pigment orangé pour le transformer en pigment vert.

Plusieurs auteurs, en particulier A. JOLLES (2) ont basé sur

(1) BIERRY et RANC, *Société biologie*.

(2) A. JOLLES, *Archiv. f. d. ges. Phys.*, LXXVII et LXXV, 446.

ces réactions des méthodes de dosage de la bilirubine. Ce sont des méthodes d'intérêt purement théorique. Elles sont en effet très délicates, un très faible excès d'halogène pouvant dépasser la coloration verte et produire une décoloration totale, en outre la fin de la coloration est difficile à observer.

Ces réactions sont surtout précieuses pour la recherche et la caractérisation de la bilirubine.

Dans cet ordre d'idée nous signalerons une réaction beaucoup plus sensible ; c'est la coloration violette que prend la bilirubine dissoute dans le chlorure de benzyl sous l'influence des halogènes, du brome en particulier. Elle nous a permis de déceler des traces infinitésimales de pigment. La matière à analyser est traitée à chaud par le chlorure de benzyl ; après filtration et refroidissement on ajoute goutte à goutte une solution très faible de brome dans du chloroforme ou de l'alcool. S'il y a de la bilirubine, le chlorure de benzyl se colore fortement en violet-bleu.

2. Nous avons vu l'action des acides halogénés sur les solutions alcalines aqueuses de bilirubine, en milieu alcoolique les résultats sont un peu différents parce que le pigment ici reste dissous dans l'alcool.

L'addition de ces acides à la solution alcoolique alcaline ne produit aucun changement de coloration. Mais si on ajoute alors de l'eau oxygénée pure on observe un verdissement intense, presque instantané à chaud. Il se fait une libération d'halogène qui agit directement ou indirectement sur le pigment. Par neutralisation à l'aide d'alcool sodé on régénère la coloration orangée primitive, qu'une nouvelle acidification fait virer au vert-émeraude, etc. Après l'action première de l'eau oxygénée on obtient ainsi, sous l'influence des acides et des bases une succession régulière de colorations vertes et orangées, qui rappellent les colorations des leuco-dérivés de la chimie organique.

De même si l'on soumet la matière verte soluble dans l'alcool méthylique provenant du traitement acide (HCl) des

calculs biliaires, à une ébullition avec de l'alcool ou de l'acétone anhydre saturé d'ammoniac gazeux sec, on obtient une liqueur d'abord verte qui devient orangée puis par refroidissement et évaporation dans une atmosphère sèche abandonne bientôt de fines aiguilles orangées très belles. Ces cristaux repris par le chloroforme ou le mélange chloroforme et tétrachlorure de carbone redonnent les petites tables classiques de bilirubine cristallisée.

3. L'acide trichloracétique fondu au bain-marie dissout en vert-émeraude la bilirubine.

Le bromal anhydre donne une belle coloration vert-bleu.

Le chloral anhydre et pur réagit d'une façon analogue. Si dans ce liquide qui vient d'être distillé et dont on ne conserve que le cœur de la distillation, on projette de la bilirubine on obtient instantanément une solution émeraude dont M. FOUARD a bien voulu étudier la conductibilité. Après avoir constaté que le chloral pur anhydre servant aux expériences, avait une conductibilité expérimentalement nulle, il a observé que l'addition de bilirubine provoque immédiatement l'apparition d'une conductibilité en même temps que la coloration verte apparaît. Dans une expérience faite à la température de $30^{\circ}2$ elle a augmenté de 97×10^{-9} à $114,5 \times 10^{-9}$ unités pratiques en une demi-heure. C'est là l'indice d'une réaction chimique continue dans laquelle se forme un composé très dissociable en ions, comme un corps à fonction acide.

Il semble bien que dans cette expérience le verdissement soit fonction d'une combinaison acide.

Cette conception est appuyée d'une façon encore plus solide par le fait suivant :

Lorsque l'on fait bouillir pendant quelques instants de la bilirubine cristallisée dans de l'acide acétique glacial, il se produit une légère coloration vert bleuâtre qui va en augmentant sans cependant devenir bien accentuée. Si alors on ajoute quelques cristaux d'un sel halogène, chlorure, bromure, iodure alcalin, aussitôt cette coloration devient beaucoup plus foncée en se rapprochant du bleu.

Ces conditions expérimentales présentent une très grande analogie avec celles qui accompagnent la préparation d'acéthémine de NENSKY et SIEBER. L'addition de NaCl à l'acide acétique permet d'obtenir très aisément le noyau hématique du pigment sanguin, mais combiné à HCl et non libre. Il se fait un coefficient de partage entre l'acide acétique et l'acide chlorhydrique et une certaine quantité de ce dernier se combine à l'hématine en quantité d'ailleurs variable comme nous l'avons démontré M. VILA et nous.

La même réaction a-t-elle lieu ici ? Nous n'avons pu encore réunir assez de matière pour doser le Cl.

La solubilité de la bilirubine dans l'acide acétique étant très faible, on ne transforme ainsi qu'une très petite quantité de pigment orangé en pigment vert. Mais on peut augmenter ce rendement de la manière suivante : dans un ballon on verse 150 centimètres cubes d'acide acétique glacial et on ajoute 5 à 8 grammes de NaCl bien pulvérisé ; on porte au bain-marie bouillant puis on fait tomber dans la liqueur goutte à goutte une solution légèrement alcaline riche en bilirubine (0 gr. 50 de pigment dans 15 centimètres cubes de liqueur alcaline). Il se fait aussitôt un verdissement intense. Si l'on filtre rapidement, par refroidissement une petite quantité de la matière précipite à l'état de bilirubine cristallisée en petits prismes orangés pâles. La transformation n'est donc que partielle ; pour être complète elle exige un chauffage de quelques minutes à feu nu, à l'ébullition.

Par concentration de la solution acétique au bain-marie sous l'influence du vide et reprise par l'eau on sépare le pigment vert à l'état amorphe.

Si, au contraire, on soumet à l'évaporation à l'air libre la solution acétique préalablement concentrée à un faible volume, on obtient en même temps qu'un dépôt salin (NaCl, CH^3COONa) un précipité vert foncé qui, examiné au microscope, présente les caractères suivants.

C'est un dépôt non homogène ; la majeure partie est cons-

tituée par une matière amorphe vert foncé granuleuse; l'autre partie est cristallisée sous deux formes :

— d'aiguilles groupées en étoiles, ou isolées, colorées en vert-bleu et polarisant la lumière ;

— de tout petits cristaux réunis en boules, en oursins, de coloration verte extrêmement foncée, polarisant très peu la lumière.

Ces expériences permettent donc d'obtenir le pigment vert à l'état cristallisé.

Nous nous réservons de revenir plus tard sur cette question.

Ces expériences, en même temps qu'elles montrent combien sont variables les conditions dans lesquelles doivent se faire la transformation du pigment orangé en pigments verts, prouvent que la bilirubine paraît posséder très certainement deux fonctions chimiques : une *fonction acide* et une *fonction basique*.

III. — Cette coexistence dans la même molécule de deux fonctions différentes n'est d'ailleurs pas une exception en biologie ; de très nombreux composés (acides amides, leucine, glycocolle, taurine, etc.) nous offrent des exemples de cette propriété qui leur donne la plasticité nécessaire aux exigences des réactions organiques complexes.

L'hématine, dans le groupe des pigments, est un type de ces substances ; elle se dissout volontiers dans les alcalis et les acides la précipitent à l'état amorphe de ces solutions basiques. D'autre part elle se combine aux acides halogénés (HCl), en donnant des chlorhydrates très bien cristallisés. NENSKY et SIEBER (1) ont préparé un de ces sels contenant en moyenne 5,20 o/o de Cl, c'est l'acéthémine, $C^{34}H^{33}O^4N^1FeCl$.

Avec A VILA (2) nous avons repris ces recherches des deux savants russes et obtenu, en faisant varier les conditions, des

(1) NENSKY et SIEBER.

NENSKY et ZALESKI, *Zeitsch. für Physiol.*, t. XXX, 1900, p. 384.

(2) PIETTRE et VILA, *C. R. Académie des sciences*, p. 734, t. CXLI.

composés également cristallisés avec des teneurs variables en Cl.

5,43

4,60

4,70

4,43

4,00

Il ne serait donc pas étonnant que les deux fonctions du pigment sanguin se retrouvent dans le pigment biliaire qui en dérive si étroitement.

CHAPITRE III

RECHERCHES BIOLOGIQUES SUR LA BILIRUBINE

Elles comprennent :

- 1° L'emploi de ce pigment comme colorant histologique ;
- 2° L'étude de sa toxicité ;
- 3° Ses relations avec le pigment sanguin, l'hématine.

I. Bilirubine colorant de tissus. — Nous ne dirons que quelques mots : il s'agit d'ailleurs plutôt d'une curiosité de laboratoire.

En solution chloroformique la bilirubine possède un pouvoir colorant très intense : « à 1 pour 40.000 elle colore encore les tissus » (DASTRE et FLORESCO).

En solution alcoolique elle se comporte vis-à-vis des éléments histologiques comme l'*aurantia*.

Les coupes après coloration des noyaux par l'hématéine ou l'hématoxyline sont lavées à l'eau, puis déshydratées et traitées par la solution alcoolique de bilirubine jusqu'à teinte nettement jaunâtre. On les lave très rapidement à l'alcool, puis à l'essence de girofle et on monte au baume.

Le pigment se fixe sur les protoplasmes et de préférence sur les globules rouges, les fibres conjonctives ou musculaires qu'il teint en jaune.

II. Toxicité de la bilirubine. — Comme toutes les questions relatives à la bile, celle-ci a été particulièrement étudiée. Les premiers auteurs s'étaient bornés à constater la toxicité de la bile totale, par injections intraveineuses ou sous-cutanées. Puis dès que les progrès de la chimie eurent permis d'isoler

les sels ou les acides biliaires on observa que ces sels introduits dans l'organisme possédaient une toxicité différente de la bile (V. DUSCH, LEYDEN, FELTZ et RITTER). Plus tard la séparation des divers sels biliaires conduisit à rechercher la toxicité de chacun d'eux (BOUCHARD). La question de la nocivité des substances pigmentaires de la bile fut soulevée pour la première fois par ce dernier auteur qui établit que la bile perd une grande partie de sa toxicité (66 o/o) lorsqu'on la prive de ses pigments par un traitement au noir animal. Ces résultats furent confirmés depuis par DE BRUIN et STOCVIS, et complétés par les recherches de CHARIN et CARNOT qui montrèrent que les effets hypothermisants de la bile doivent être attribués aux pigments biliaires.

BOUCHARD (1), TAPRET et DE BRUIN (2) fixent à 0 gr. 05 par kilogramme d'animal la dose toxique de la bilirubine.

Nous avons repris les mêmes recherches en faisant remarquer, comme RYWOSCH, les imperfections de leur technique. Ils utilisaient en effet comme solvant du pigment biliaire la lessive de soude étendue. Or on sait et nous avons vérifié que des quantités mêmes très faibles de soude caustique introduites sous la peau provoquent des lésions graves, locales et générales ; lorsqu'elles sont faites en péritoine les animaux succombent avec des symptômes de péritonite exsudative.

Nos premiers efforts ont porté sur une solubilisation non toxique par elle-même du pigment.

La bilirubine bien pulvérisée est dissoute dans le plus faible volume possible de lessive de soude, puis additionnée d'eau distillée. On neutralise *exactement* au tournesol l'alcali par HCl, puis on ajoute du carbonate de soude en solution étendue. On filtre et on fait un volume connu.

La liqueur contient en solution du pigment, du chlorure de sodium et du carbonate de soude. Elle possède une belle

(1) BOUCHARD, *Les auto-intoxications*.

(2) BOUCHARD et TAPRET, J. DE BRUIN, *Akadem. proefschr. Amsterdam*, 1889.

coloration orangée : la réaction est légèrement alcaline, et la saveur à peine saline.

Il est indispensable d'employer d'abord la soude pour dissoudre la bilirubine ; le carbonate de soude impuissant à remplir ce rôle de solvant peut lui être substitué après cette première dépolymérisation ou hydratation du pigment.

Les quantités de carbonate de soude pouvant être employées sans danger avaient été déterminées par des expériences préliminaires.

Nous avons d'abord injecté dans ce but à 5 cobayes, sous la peau ou en péritoine des volumes connus d'une solution contenant 2 gr. 64 o/o de carbonate de soude pur et sec.

Cobaye n° 1 (poids = 425), cobaye n° 2 (poids = 480), reçoivent 5 centimètres cubes de cette solution en péritoine.

Cobaye n° 3 (poids = 340), cobaye n° 4 (poids = 405), reçoivent 5 centimètres cubes en péritoine et 5 centimètres cubes sous la peau.

Cobaye n° 5 (poids = 420), cobaye n° 6 (poids = 380), reçoivent 10 centimètres cubes sous la peau.

Quatre de ces animaux ont succombé en moins de 24 heures avec des lésions graves de péritonite exsudative et d'infiltration au niveau des inoculations hypodermiques.

Deux seulement ont résisté, les n°s 4 et 5, après être restés pendant 3 jours très malades, sans force, sans appétit.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons injecté une solution renfermant seulement 1 gr. 32 de carbonate pur et sec.

Cobaye n° 7 (poids = 308), reçoit 10 centimètres cubes en péritoine.

Cobaye n° 8 (poids = 405), » » » »

Cobaye n° 9 (poids = 450), reçoit 10 centimètres cubes sous la peau.

Cobaye n° 10 (poids = 410), » » » »

Cobaye n° 11 (poids = 480), reçoit 10 centimètres cubes en péritoine et 3 centimètres cubes sous la peau.

Aucun de ces sujets n'a succombé, 48 heures après l'injection ils avaient retrouvé leur vigueur primitive.

La dose toxique de carbonate de soude est donc comprise entre ces deux chiffres : 2,64 et 1,32.

Dans les recherches suivantes faites avec la bilirubine, nous sommes toujours restés au-dessous de la limite inférieure, c'est-à-dire au-dessous de 1 gr. 32 o/o.

Première série d'expériences. — 0 gr. 4596 de bilirubine sont dissous

dans 2 centimètres cubes de lessive de soude que l'on étend d'eau à 25 centimètres cubes ; on neutralise exactement par l'acide chlorhydrique dilué et aussitôt on ajoute 4 centimètres cubes d'une solution de CO^3Na^2 à 13,33 o/o. On filtre et on fait un volume de 125 cc. contenant par conséquent 0 gr. 528 de sel sec.

14 février. On inocule 5 cobayes avec cette solution.

Cobaye n° 1 (poids=545), reçoit 2 centimètres cubes sous la peau, cuisse droite, 3 en péritoine.

Cobaye n° 2 (poids=470), reçoit 4 cm³ 1/2 en péritoine.

Cobaye n° 3 (poids=590), reçoit 5 centimètres cubes sous la peau de la cuisse.

Cobaye n° 4 (poids=455), reçoit 5 centimètres cubes sous la peau de la cuisse.

Cobaye n° 5 (poids=330), reçoit 5 centimètres cubes en arrière de l'épaule droite.

Le 15, les animaux paraissent un peu gênés dans leur mouvement.

Le 16, ils ont repris leur aspect normal.

Le 17, on les inocule à nouveau avec des quantités plus grandes de liqueur, tous reçoivent 10 centimètres cubes, 5 centimètres cubes en péritoine, et 5 sous la peau.

Le lendemain et les jours suivants les animaux sont affaiblis, indolents, ne mangent pas ou très peu ; l'abdomen est volumineux, tendu, sensible, puis assez vite ces phénomènes aigus s'atténuent et disparaissent.

L'urine n'a jamais paru pigmentée d'une façon anormale.

Les inoculations sous-cutanées ont provoqué des lésions locales, œdémateuses, douloureuses, qui très rapidement ont évolué vers la cicatrisation fibreuse ou bien souvent ont abouti à des nécroses plus ou moins étendues.

Le pigment lui-même a parcouru le cycle classique de ses transformations. Dès que les phénomènes aigus se sont atténués on constate au niveau des injections hypodermiques que le tégument devient jaune orange, puis jaune pâle, vire au vert et enfin disparaît en l'espace de 10 jours environ.

Ces animaux ont été sacrifiés en pleine santé pour suivre l'évolution progressive du pigment biliaire.

Le 24 février on tue le cobaye n° 1 (poids=510, perte de poids 35 gr.) qui a reçu 7 centimètres cubes sous la peau et 8 centimètres cubes en péritoine.

Autopsie : Au niveau de l'injection sous l'abdomen il existe un dépôt fibrineux de la grosseur d'une petite noisette, de coloration légèrement orangée, et entourant ce noyau en voie d'organisation fibreuse, une légère infiltration jaunâtre.

Dans le péritoine, présence de traces de pigment, mais avec des localisations assez spéciales ; le feuillet pariétal est normal sauf au niveau des gaines vaginales qui sont fortement teintées en jaune safran.

Le tissu adipeux contenu entre les deux lames du feuillet mésentérique présente une coloration générale jaune serin mais beaucoup plus net-

tement accentuée le long des vaisseaux lymphatiques ; les ganglions situés sur leur parcours sont vivement colorés et attirent de suite l'attention.

La localisation pigmentaire est surtout abondante dans toute l'étendue du grand épiploon qui offre l'aspect d'une fine dentelle jaune d'or avec des punctuations de teinte plus foncée qui sont constituées par des granulations lymphoïdes.

Les viscères abdominaux et thoraciques ne présentent rien d'anormal. Urine et bile de la vésicule sans coloration ictérique.

28 février. Le cobaye n° 3 est tué (poids=570, perte 20 gr.), reçu 5 centimètres cubes sous la peau de la cuisse et 10 centimètres cubes en péritoine.

Autopsie : Au niveau de la peau petit foyer de nécrose, fortement pigmenté, sans teinture périphérique ; le ganglion inguinal englobé dans la lésion est fortement hypodermique mais à peine coloré.

Dans la cavité abdominale la bilirubine est uniquement localisée aux gaines vaginales, aux granulations lymphatiques du mésentère et surtout à la partie du grand épiploon voisine du foie.

3 mars. Cobaye n° 2 (poids=400, perte 70 gr.).

On lui a injecté 10 centimètres cubes sous la peau en deux régions et 5 centimètres cubes en péritoine.

Autopsie : Il ne subsiste sous la peau que deux petits foyers fibreux presque décolorés, le tissu conjonctif périphérique à sa coloration blanche habituelle.

L'absorption de la bilirubine au niveau de la peau est donc totale au bout de 20 jours environ.

Dans le péritoine les seules traces de pigmentation se trouvent le long de la chaîne ganglionnaire mésentérique et sur toute l'étendue de l'épiploon.

3 mars. Cobaye n° 4 (poids=350, perte 105 gr.).

Les lésions de la peau sont totalement décolorées ; il ne subsiste qu'un faible épaissement fibreux.

Dans le péritoine : rares granulations jaune-orangées dans toute l'étendue de l'épiploon et le long du bord mésentérique de l'intestin. On saisit sur le vif la disparition progressive du pigment ; en effet certains ganglions possèdent encore une teinte jaune extrêmement pâle, d'autres ont déjà une partie de leur substance complètement incolore.

5 mars. Cobaye n° 5 (poids=340, augmentation 10 gr.).

On ne retrouve aucune trace des injections hypodermiques.

Le grand épiploon est seul coloré.

2^e série d'inoculations, avec la même solution de bilirubine.

14 mars. Cobaye n° 6 (poids=625), reçoit 10 en péritoine, 5 centimètres cubes sous la peau du flanc.

Cobaye n° 7 (poids=428), reçoit 10 en péritoine, 6 centimètres cubes sous la peau du flanc.

Cobaye n° 8 (poids=515), reçoit 10 en péritoine, 8 centimètres cubes en deux injections à la cuisse.

Cobaye n° 9 (poids = 395), reçoit 8 en péritoine, 4 centimètres cubes sous la peau.

Le 15 mars le cobaye n° 8 est trouvé mort dans sa cage.

Autopsie : Au niveau des points d'inoculation, sous la peau, larges foyers ordémateux, avec au centre des trainées nettement verdâtres ; sur la coupe s'écoule une petite quantité de solution injectée la veille et qui n'a pu être résorbée.

Dans la cavité abdominale, exsudat abondant, fortement coloré en orangé ; tous les organes sont imprégnés de pigment.

Les autres animaux après quelques jours d'abattement guérissent et sont sacrifiés à des dates différentes.

23 mars. Le cobaye n° 6 (poids = 560, perte 65 gr.) est tué.

Noyau fibreux sous-cutané jaune pâle, même coloration du tissu conjonctif périphérique.

Localisation du pigment aux ganglions mésentériques et à l'épiploon.

Ce qui frappe le plus à l'examen de ce cadavre c'est une teinte jaune clair de tous les tissus sauf les cartilages, les os et les muqueuses externes et internes.

C'est là le caractère des ictères chroniques.

4 avril cobaye n° 7 (poids = 380).

Même répartition du pigment ; ictère chronique avec en plus ici coloration jaune des cartilages du cercle de l'hypochondre.

Le contenu de la vésicule biliaire est d'un très beau jaune safran ; c'est le seul exemple où nous ayons constaté si nettement le passage de la bilirubine dans la vésicule et par conséquent son élimination par le foie.

13 avril. Cobaye n° 9 (poids = 380).

Lésions sous-cutanées totalement guéries.

Dans l'abdomen rares localisations pigmentaires au système lymphatique intestinal ; mais la coloration n'est plus ni orangée, ni jaune, mais tend vers une teinte brunâtre, indice de l'évolution sur place du pigment.

Dans ces expériences, nous n'avons eu qu'un cas de mort, la dose toxique n'a donc pas été atteinte ; mais nous avons pu suivre l'évolution de la bilirubine dans l'organisme, son absorption, sa répartition et la durée d'élimination.

Après son introduction sous la peau, la bilirubine subit sur place l'évolution classique difficile d'ailleurs à observer à cause de la pigmentation de la peau chez le cobaye.

Dès le deuxième jour le tégument commence à se teindre très discrètement en jaune, puis dans les jours suivants au centre de cette zone devient visible par transparence une teinte verdâtre qui imprègne les couches profondes du derme. Bientôt toute trace apparente de pigmentation disparaît. L'élimination du pigment demande un temps relativement long qui dépend surtout des lésions locales qui accompagnent l'inoculation. Lorsqu'il se fait un foyer de nécrose, la bilirubine qui l'imprègne ne subit aucune modification ; au contraire lorsqu'il s'agit d'une simple sclérose du tissu conjonctif, l'absorption se poursuit progressivement et devient complète après 25 à 30 jours. L'évolution intra-péritonéale se fait parallèlement à

la précédente, il se produit d'abord une imprégnation de tous les organes viscéraux comme on l'a constaté sur le cobaye (n° 8). Puis la résorption s'opère rapidement sur toute la surface péritonéale ; dès le 9^e jour (cobaye n° 1) on ne retrouve plus que des localisations dans les gaines vaginales, dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques du mésentère et sur toute l'étendue du grand épiploon ; au bout de 25 à 30 jours l'imprégnation des vaginales, et des lymphatiques a cessé ; il ne reste de traces de pigments que dans les ganglions mésentériques et dans l'épiploon. Un minimum de 35 à 40 jours est nécessaire pour que l'élimination soit totale **à 1 niveau du péritoine.**

La disparition du pigment se fait par passage dans la circulation générale mais à cause de sa lenteur elle passe inaperçue ; dans un seul cas nous avons pu cependant la surprendre : le cobaye n° 6 sacrifié 9 jours après injection a présenté une infiltration ictérique généralisée.

15 avril. 3^e série d'expériences, faites avec une solution plus riche en pigment. 1 gr. 052 de bilirubine sont dissous dans 3 cc. 5 de soude étendue, on neutralise avec HCl puis on ajoute 2 centimètres cubes de solution de Co^2Na^2 à 13,33 o/o et on fait un volume de 50 centimètres cubes.

La nouvelle solution contient donc 2 gr. 10 o/o de matière colorante.

Le 16 avril on inocule 4 cobayes.

Cobaye n° 10 (poids=350), reçoit 10 centimètres cubes en péritoine.

Cobaye n° 11 (poids=430), reçoit 10 centimètres cubes en péritoine.

Cobaye n° 12 (poids=525), reçoit 5 centimètres cubes en péritoine et 5 centimètres cubes sous la peau.

Cobaye n° 13 (poids=525), reçoit 5 centimètres cube en péritoine et 5 centimètres cubes sous la peau.

Le 18, le cobaye n° 10 a succombé.

Dans la cavité abdominale, présence d'une petite quantité de liquide séro-sanguinolent à peine coloré en jaune ; la presque totalité du pigment est déjà fixée sur les gaines vaginales, mésentère et épiploon.

Urine et bile de la vésicule, normales.

Le 19, sur le cadavre du cobaye n° 11, localisations identiques de la bilirubine.

Le 22 mort du n° 12. Volumineux œdème en plaque avec exsudation fibrineuse, coloration générale jaune orangée et verdâtre par places.

Le 28, on sacrifie le n° 13, qui après 3 jours de maladie a repris le dessus ; imprégnation de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané, localisations péritonéales signalées plus haut.

2 mai. 4^e série d'expériences. Inoculation de doses massives de même solution.

Cobayes n°s 14 et 15, reçoivent 10 centimètres cubes sous la peau et 5 centimètres cubes en péritoine.

Cobayes n°s 16 et 17, reçoivent 10 centimètres cubes en péritoine et 5 centimètres cubes sous la peau.

Les deux premiers meurent le 4 mai ; au niveau de la région d'inoculation, large foyer fibrineux vert-émeraude au centre, jaune-orangé à la périphérie et jaune pâle au loin.

Dans le péritoine, congestion de tous les organes, et forte teinte orangée de toute la séreuse.

La vésicule biliaire du cobaye n° 15 renferme de la bile fortement colorée en jaune, recueillie et épurée au chloroforme, on isole de la bilirubine.

C'est le deuxième cas où on a retrouvé le pigment dans la poche biliaire ; ici cette observation acquiert une importance considérable de ce fait que le passage dans la bile commence très rapidement, deux jours après l'injection.

Cette observation permet de conclure que l'élimination du pigment se fait par le foie et de là par l'intestin.

L'appareil urinaire ne joue donc pas le rôle d'émonctoire physiologique vis-à-vis de ces produits biliaires ; ce n'est que dans les ictères graves que cela a lieu.

Les cobayes n°s 15 et 16 meurent le 5 avec des lésions identiques, mais sans modifications de la bile.

Au point de vue toxicité on conclut de ces expériences que la dose mortelle pour le cobaye est d'environ 0 gr. 525 de bilirubine cristallisée par kilogramme d'animal, en injection intrapéritonéale, et qu'elle est encore supérieure par injection hypodermique.

Ces résultats sont donc notablement différents de ceux de BOUCHARD, TAPRET et DE BRUIN ; nous en avons vu la raison.

Nous en tirerons une autre conclusion plus générale d'ordre purement physiologique en ce qui concerne la marche de l'absorption et de l'élimination pigmentaire.

Ces deux phénomènes sont d'autant plus rapides que l'incubation s'accompagne de lésions moindres. La production de désordres locaux, œdèmes, dépôt fibrineux fixent en effet sur place le pigment et retardent plus ou moins la diffusion de la substance, le passage dans la circulation générale.

Nous avons déjà démontré un fait semblable pour le pigment sanguin.

L'injection de solution aqueuse d'hémoglobine cristallisée s'accompagne d'une absorption très rapide, car la matière est à l'état soluble donc très facilement diffusible. Au contraire l'injection de la même quantité d'hémoglobine encore fixée sur le stroma globulaire demande un temps incomparablement plus long pour que l'élimination soit com-

plète; c'est que le pigment retenu à l'état insoluble ne peut passer directement dans l'économie ; aussi subit-il une lente évolution locale, une digestion intracellulaire sous l'influence des leucocytes surtout, qui aboutit à la transformation classique en pigments biliaires, jaunes, verts, bleus.

CHAPITRE IV

RELATIONS CHIMIQUES ENTRE L'HÉMATINE ET LA BILIRUBINE

Cette importante question a fait l'objet de très nombreux travaux aussi bien dans le domaine de la chimie que dans celui de la physiologie.

La conclusion des biologistes est que la bilirubine paraît tirer son origine de la matière colorante du sang, l'hémoglobine.

Les arguments classiques sont tirés des phénomènes d'oxydation qui s'opèrent dans le sang et les tissus.

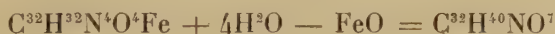
C'est d'abord la libération de l'hémoglobine dans le sang ou les tissus qui aboutit à l'apparition correspondante de produits regardés comme identiques aux pigmentaires biliaires ou à leurs dérivés et qui s'éliminent par la bile (expériences de FRERICHs, de NOTHNAGEL, de LANDOIS, HERMANN, WERTHEIMER et MEYER, de KÜHNE et TARCHANOFF).

Puis l'évolution des extravasats sanguins où l'on peut suivre la transformation de l'hémoglobine en la série des colorations qui rappellent celles de la réaction de GMELIN.

Enfin ce sont des analogies de réactions ou de propriétés :

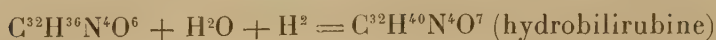
1° Par réduction du pigment sanguin et de la bilirubine on obtiendrait deux produits de même composition centésimale.

D'une part l'urobiline (réduction de l'hémoglobine ou de l'hématine en milieu acide, acide chlorhydrique et zinc) d'après l'équation de HOPPE-SEYLER :

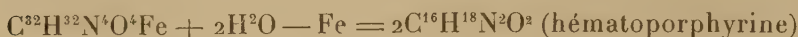


d'autre part l'hydrobilirubine (réduction de la bilirubine ou

de la biliverdine en milieu alcalin, amalgame de sodium) d'après l'équation de MALY :



2° L'attaque de l'hématine sous l'influence des acides forts donnerait l'hématoporphyrine isomère de la bilirubine d'après l'équation :



Tous ces arguments n'ont évidemment pas la même valeur ; les deux premiers correspondent à des observations physiologiques, c'est-à-dire à des réalités ; les derniers au contraire sont plutôt théoriques et la mise en formule ne leur donne pas d'autre valeur que celles d'hypothèses.

Les recherches chimiques les plus remarquables sont dues au savant allemand WILLIAMS KÜSTER qui a montré l'existence dans la molécule de la bilirubine des mêmes acides hématiques que dans l'hématine ; nous reviendrons sur ce point.

Nous-mêmes nous sommes parvenus à établir une relation extrêmement intéressante au point de vue biologique général entre les deux pigments les plus importants de l'organisme, en isolant de la bilirubine la même chaîne grasse que nous avions signalée A. VILA (1) et nous dans nos recherches sur l'hématine.

Nous avons, en effet, montré que le noyau ferrugineux du pigment sanguin soumis à des saponifications ménagées libère une matière ternaire dont nous avons fixé la composition par les analyses suivantes :

	<u>C</u>	<u>H</u>	
I.	77,0	10,83	acéthémine de NENSKY et SIEBER
II.	77,6	10,43	
	<u>C</u>	<u>H</u>	
	76,6	10,67	hématine cristallisée (sang de cheval)

Le rendement de l'hématine en cette substance atteint

(1) PIETTRE et VILA, *C. R. Académie des sciences*, p. 1041, t. CXLI, 1905.

35 o/o. On voit quelle en est l'importance puisque son poids s'élève au tiers de la molécule totale.

C'est en nous basant sur les relations classiques entre le pigment sanguin et le pigment biliaire que nous avons été conduits à rechercher dans ce dernier la présence des chaînes grasses à côté du noyau azoté.

Nous avons appliqué à la bilirubine la même méthode de traitement que pour l'hématine.

Le pigment biliaire est dissout dans l'alcool sodé puis chauffé au bain-marie, avec réfrigérant à reflux. Après un temps suffisant de chauffe, on distille l'alcool et on reprend par l'eau. La solution aqueuse est alors épuisée par l'éther puis neutralisée par un acide, HCl ou SO^4H^2 . Il se fait un précipité floconneux verdâtre qui est isolé, lavé et séché et remis en attaque ; dans les eaux reste une partie soluble qui après évaporation apparaît sous l'aspect d'une substance amorphe, de coloration brunâtre, riche en azote.

On sépare donc à chaque saponification la matière en deux tronçons principaux :

1^o Une partie non azotée, soluble dans l'éther, qui représente les chaînes grasses ;

2^o Le complément brunâtre, riche en azote, de nature pyrrolique et qui lui-même peut-être séparé en deux portions : l'une, la plus importante de beaucoup, est insoluble dans l'éther, l'autre nettement soluble au contraire.

Enfin on retrouve un poids plus ou moins élevé de matière initiale non modifiée ou attaquée incomplètement.

La saponification, en effet, n'est jamais complète du premier coup ; elle s'opère progressivement par petits paquets et avec grand'peine.

Nous décrirons quelques-unes de nos expériences.

EXEMPLES EXPERIMENTAUX.

1. — On part de 0,885 de bilirubine cristallisée qu'on pulvérise avec soin dans un mortier. On dissout dans de l'alcool sodé contenant 80 gr. de sodium par litre d'alcool méthylique.

Cette dissolution est délicate ; on la réalise en versant de petites quantités de réactif sur la matière et en triturant quelques minutes le mélange. Une partie du pigment passe dans l'alcool sodé qui prend une coloration orangée. Après repos on peut décanter la solution claire et traiter à nouveau l'insoluble par une nouvelle quantité de solvant et ainsi jusqu'à dissolution totale. A chaque épuisement, il est commode de s'aider d'alcool pur comme liqueur de lavage. Dans cette expérience 20 centimètres cubes d'alcool sodé ont suffi pour dissoudre toute la bilirubine. Nous nous permettons de recommander cette technique. Les liqueurs sont versées dans un ballon et complétées de façon à contenir :

alcool méthylique sodé à 8 o/o = 30 centimètres cubes.

alcool méthylique à 90° = 300 centimètres cubes.

on porte au bain-marie le ballon relié au réfrigérant ascendant et on chauffe à l'ébullition pendant 12 heures.

Très vite la liqueur passe de la liqueur orangée à une teinte verte émeraude qui persiste jusqu'à la fin de l'expérience. Ce virage se fait au bout de 10 à 15 minutes d'ébullition.

On distille alors l'alcool puis on reprend par 300 à 400 centimètres cubes d'eau.

La liqueur aqueuse est versée dans une boule à robinet puis soumise à un épuisement étheré renouvelé, 4 à 5 fois.

On isole ainsi plusieurs extraits étherés qui sont réunis, puis lavés à neutralité pour dissoudre les traces de solution alcaline entraînée.

L'éther possède une faible teinte jaune ; il abandonne par distillation des gouttes huileuses jaunâtres.

On reprend ce résidu par de petites quantités du même solvant et on évapore dans un vase taré.

Le poids de matière sèche isolée est de 0,050.

C'est une substance de consistance huileuse, de saveur très douce.

Le rendement dans cette première attaque est de 5,64 %.

La solution aqueuse débarrassée de la partie soluble dans l'éther est à son tour traitée.

On la neutralise au tournesol à la touche par HCl ou SO_4H^2 ; il se produit un trouble qui se résout en un précipité floconneux verdâtre ; après repos on décante les eaux claires, on filtre sur trompe le précipité, et on le lave à neutralité. Après dessiccation il peut être remis en attaque.

Les eaux neutres ou très légèrement acides sont concentrées à sec, on a alors au milieu de cristaux minéraux une matière amorphe brunâtre.

La séparation s'obtient en lessivant les sels avec de l'alcool méthylique fort qui dissout aisément la partie organique.

Ce premier traitement aboutit donc comme nous l'avons déjà dit à une scission incomplète de la bilirubine.

Il reste un gros faisceau de pigment verdâtre qui représente la partie la plus importante de la matière mise en œuvre et qui n'a subi qu'une attaque presque insignifiante ; elle est en effet, très soluble dans les alcalis et précipitée par les acides.

On la soumet de nouveau au même traitement.

2. — Le filtre auquel elle adhère fortement est lessivé avec 25 centimètres cubes d'alcool méthylique sodé à 8 o/o. On rince avec de l'alcool et on complète de façon à faire un volume contenant :

alcool méthylique sodé = 60 centimètres cubes.

alcool 90° = 300 centimètres cubes.

Dans cette deuxième attaque la quantité d'alcali est donc doublée.

On chauffe au bain-marie à l'ébullition, 12 heures, on distille l'alcool et on reprend par 500 centimètres cubes d'eau.

La solution alcaline aqueuse est épuisée par 900 centimètres cubes d'éther en 4 fois.

On isole ainsi 0,073 de matière grasse.

La soude est neutralisée par HCl. Le précipité verdâtre obtenu et recueilli après repos, lavé et séché.

On concentre les eaux-mères à siccité et on épuise les substances minérales par l'alcool.

Le deuxième rendement en matière soluble dans l'éther s'élève à 8,24 %, il est nettement supérieur au premier.

3. — Le résidu pigmentaire verdâtre est traité une dernière fois.

On le dissout dans 60 centimètres cubes d'alcool sodé auquel on ajoute 250 centimètres cubes d'alcool méthylique.

Après 15 heures de chauffe, l'alcool est distillé, le résidu repris par 350 centimètres cubes d'eau, et épuisé par 800 centimètres cubes d'éther.

On obtient 0,071 d'extract éthéré.

La liqueur alcaline aqueuse neutralisée par HCl donne un précipité très peu abondant, de coloration brunâtre et non verdâtre, trop faible pour être de nouveau attaqué.

On sépare des sels la matière azotée par l'alcool.

Le troisième rendement en substance grasse est de 8.02 o/o.

Si en additionne les rendements partiels obtenus dans ces opérations, on arrive à un rendement total de 22 gr. 5 de matières grasses pour 100 gr. de pigment biliaire.

4. — On part de 1 gr. 657 de biliburine que l'on dissout dans :

Alcool méthylique sodé = 65 centimètres cubes.

Alcool 90° = 600 centimètres cubes.

Après 18 heures de chauffe on distille l'alcool. Le résidu repris par 600 centimètres cubes d'eau et épuisé par 900 cm³ d'éther donne 0,190 d'extract.

Les eaux alcalines neutralisées par SO₃H² étendu donnent un abondant précipité verdâtre.

Cette substance est reprise par :

alcool méthylique sodé = 60 centimètres cubes.

alcool = 700 centimètres cubes.

On chauffe 21 heures.

On obtient 0,121 d'extrait étheré.

Une troisième attaque dans les mêmes conditions donne 0,090 d'extrait.

Enfin une quatrième libère 0,067.

Le rendement total est de 0,468.

et 0/o de pigment engagé = 28,31.

5. — On pratique dans cette expérience la saponification à l'aide de potasse alcoolique ; 1 gr. 725 de bilirubine sont dissous dans 300 centimètres cubes d'alcool éthylique à 95° contenant 6 gr. 0/o de potasse solide.

On chauffe 24 heures au bain-marie.

L'alcool est chassé par distillation ; on constate pendant cette distillation qu'il se produit un léger dégagement d'ammoniac dès qu'on est arrivé à n'avoir plus que 25 à 30 centimètres cubes de liqueur dans le ballon.

C'est la seule fois que nous avons fait cette observation. La distillation est alors arrêtée ; on reprend par l'eau et on épuise à l'éther.

Le poids de matière grasse obtenue est de 0,20, c'est-à-dire 15 0/o.

Un deuxième traitement est fait à la potasse aqueuse à 2,5 0/o.

On dissout le pigment vert dans 300 centimètres cubes de cette solution et on porte à l'ébullition au bain d'huile entre 125 et 130°.

On chauffe 20 heures.

Après refroidissement on épuise directement par l'éther, on isole 0,127 de matière.

La neutralisation des eaux-mères alcalines par HCl donne un précipité brúnâtre.

Le rendement en matières grasses a été de 18,66 0/o, par conséquent nettement supérieur à ce que donne la saponification par l'alcool sodé.

Il semble donc préférable à l'avenir de suivre cette marche en utilisant toujours des solutions alcalines faibles.

Malheureusement cette expérience n'a pas été poussée au bout, la matière ayant été égarée.

6. — On substitue le potassium au sodium, alcool potassé à 5 0/o.

3 gr. de bilirubine cristallisée sont dissous dans :

alcool méthylique potassé = 60 centimètres cubes.

alcool = 500 centimètres cubes.

On chauffe 26 heures à l'ébullition au réfrigérant à reflux.

Après distillation de l'alcool et reprise par 500 centimètres cubes d'eau, on épuise à l'éther qui enlève 0,035 de matière.

Rendement très faible = 1,13 0/o, en relation sans doute avec la faible quantité de potassium (2 gr. 4).

La substance verte précitée par HCl est attaquée de nouveau en présence d'un poids supérieur de métal (6 gr. 4 de K.).

alcool méthylique potassé = 160 centimètres cubes.

alcool = 500 centimètres cubes.

On chauffe 22 heures.

L'extrait étheré est de 0 gr. 083, c'est-à-dire 2,76 0/o.

On revient à l'alcool sodé à 8 0/o et on engage un poids égal de sodium (6 g. 4).

alcool méthylique sodé = 80 centimètres cubes.

alcool = 500 centimètres cubes.

Ebullition, 30 heures.

Extrait éthéré = 0,073, très voisin de celui donné par l'alcool potassé à même teneur métallique.

Une deuxième attaque dans les mêmes conditions donne après 25 heures un extrait = 0,162.

Enfin par un traitement à la potasse aqueuse (4,25 o/o de KOH), on obtient 0,225 de matières grasses.

La saponification n'a pas été poussée jusqu'au bout. Le rendement en extrait éthéré n'a pas dépassé 16,76 o/o.

7. — On traite 1 gr. 642 de bilirubine par de l'alcool à 11,5 o/o de sodium.

alcool méthylique sodé = 40 centimètres cubes.

alcool = 500 centimètres cubes.

Chauffage, 26 heures.

Poids de l'extrait éthéré = 0,061.

La neutralisation par HCl des eaux alcalines donne un précipité floconneux brun-orangé et non plus vert.

β. — Attaque par le mélange suivant :

alcool méthylique sodé = 80 centimètres cubes.

alcool = 1.000 centimètres cubes.

Extrait éthéré = 0,053.

γ. — On augmente la quantité d'alcali :

alcool méthylique sodé = 160 centimètres cubes.

alcool = 1.000 centimètres cubes.

Poids de l'extrait = 0,160.

δ. — On traite enfin le résidu par la potasse aqueuse à 3 o/o.

Chauffage au bain d'huile à 125-130 pendant 25 heures.

Poids de l'extrait = 0,120.

Le rendement total est donc de 0 gr. 394, c'est-à-dire 24,02 o/o.

CONCLUSIONS. — Ces expériences démontrent qu'il est possible, par saponifications répétées, d'isoler dans la molécule pigmentaire deux groupes principaux dont nous allons seulement indiquer les propriétés les plus importantes.

Partie azotée. — Le noyau azotée est une matière brune, de saveur légèrement styptique, d'odeur résineuse rappelant l'odeur de bois.

On l'obtient en concentrant au bain-marie les eaux-mères

aqueuses après précipitation par les acides du pigment vert ou brun non complètement saponifié.

Ce noyau a donc été soluble dans l'eau.

On le sépare des sels minéraux en épuisant le mélange par l'alcool, de préférence l'alcool méthylique.

Ainsi isolé, on constate qu'il a subi des modifications manifestes. D'ailleurs, pendant la concentration, en présence même d'une très légère acidité, les eaux d'abord jaunes ont bruni peu à peu, déposant à l'état de flocons amorphes brun foncé la matière jusque-là en solution. Il s'est fait une condensation, une résinification plus ou moins profonde. Après distillation de l'alcool méthylique, on obtient un extrait sirupeux, brunâtre, très hygroscopique. Si on le reprend avec de l'eau légèrement chlorhydrique ou sulfurique, la précipitation est totale à l'état de dépôt lamelleux brun orangé dont la solubilité dans l'eau est devenue extrêmement faible. C'est une matière riche en azote, à fonction acide, qui n'a pas été analysée.

Bien que paraissant homogène, elle peut cependant être séparée en deux faisceaux.

Si, en effet, avant d'évaporer à sec les eaux débarrassées de la partie pigmentaire non encore complètement saponifiée, on les épuise à l'éther, on sépare une substance résineuse, brunâtre, à odeur très spéciale de bois, soluble dans les alcools, à fonction également acide. Peu importante en poids, elle n'en existe pas moins et mérite d'être signalée.

Soumis à l'hydrolyse acide, le faisceau azotée de la molécule bilirubine ne nous a donné encore aucun résultat satisfaisant ; on obtient des produits résineux noirâtres de condensation.

Partie grasse. — Le noyau gras est une très belle matière huileuse, de coloration blonde, ou très légèrement jaunâtre, ayant l'apparence évidente d'acide gras.

Très soluble dans l'éther, les alcools, le chloroforme, la benzine, l'acétone. Elle se dissout également dans les alcalis caustiques étendus et dans le carbonate de soude. Les acides la précipitent de ses solutions alcalines sous forme de fines

gouttelettes huileuses. C'est donc une substance à fonction acide.

L'analyse élémentaire donne :

Combustion

I. Matière = 0,2175	Acide carbonique = 0,5760
	Eau = 0,2447
II. Matière = 0,1364	Acide carbonique = 0,3579
	Eau = 0,1549

soit en centièmes :

C = 72
H = 10,55

Ces résultats rapprochés de ceux donnés pour l'hématine cristallisée indiquent qu'il s'agit des mêmes substances.

Ce sont des corps de l'ordre des acides gras élevés, de la série alliphatique.

Le rendement moyen est de 25 o/o ; dans certaines expériences, il s'est élevé à 28 o/o.

Provisoirement, admettons le chiffre de 25 o/o. Nous avons vu pour l'hémoglobine qu'il est de 35 o/o. Il y a donc une différence de 10 o/o entre ces deux pigments, en faveur du dernier.

C'est là un résultat numérique brutal fort important dont l'intérêt n'échappera à personne.

Si, à la lumière de ce fait, on compare les formules de l'hématine $C^{32}H^{32}O^4N^4Fe$, et de la biliburine $C^{16}H^{18}N^2O^3$, on est conduit à conclure que dans les transformations plus ou moins complexes, au sein de l'organisme, du pigment sanguin en pigment biliaire, le fer est éliminé en même temps que ces 10 o/o de matières grasses.

Une dernière conséquence est le rejet de la formule entièrement cyclique donnée par NENSKY et ZALESKI au noyau ferugineux pigmentaire du sang, déjà critiquée par A. VILA et nous-même parce qu'elle nous apparaît comme une pure hypothèse.

Enfin cette notion des chaînes longues apporte une contri-

bution très utile pour l'étude de la constitution du noyau hémétique et surtout des relations entre les deux pigments sanguin et biliaire.

Ce dernier point nous arrêtera quelques instants.

Nous avons vu plus haut que NENSKY et SIEBER, NENSKY et ZALESKI ont proposé des formules chimiques de liaison entre l'hématine et l'hématoporphyrine. D'autre part ces savants ont cru pouvoir établir des relations entre cette dernière substance et la bilirubine en se basant sur de simples analogies d'abaissements cryoscopiques dont l'appréciation est insuffisamment rigoureuse pour des substances à poids moléculaires si élevés. Leurs conclusions ont été contestées, en particulier par le professeur A. GAUTIER.

La solution, par cette voie détournée de l'isomérisie, reste donc à chercher.

W. KÜSTER et KOLLE ont apporté une contribution beaucoup plus sérieuse à la solution de cet important problème de biologie générale. Ces deux savants ont, en effet, isolé par oxydation de ces deux pigments, hématine et bilirubine, sous l'influence des chromates ou des bichromates, les mêmes acides hémétiques, $C^8H^8NO^6$ et $C^8H^8O^6$.

En outre, reprenant les travaux de NENSKY et ZALESKI sur l'hématine et les étendant à la bilirubine, ils ont montré que la réduction énergique par l'iodure de phosphonium et l'acide iodhydrique permet de séparer dans les deux cas des produits pyrroliques.

En réalité ces deux faits ne sont pas totalement indépendants, ils se confondent en un seul. L'étude des formules des acides hémétiques et des composés pyrroliques conduit à admettre une origine commune, et d'après KÜSTER d'ailleurs les acides hémétiques dérivent très certainement des noyaux pyrroliques de la molécule de l'hématine.

Nous sommes ainsi ramenés à la notion première dégagée par NENSKY et ZALESKI sur la présence dans le pigment ferrugineux sanguin de noyaux pyrroliques en forte proportion.

Mais alors la parenté entre l'hématine et la bilirubine basée

principalement sur l'existence de ces noyaux azotés en C⁵ dans les deux molécules perd une part de sa solidité. Il résulte, en effet, de nombreux travaux récents, que le noyau pyrrol se retrouve un peu partout, dans le noyau des albumines, des peptones, etc., et récemment NENSKY et MARCHLEWSKY, en étudiant les dérivés de la phylloporphyrine, ont montré que si l'on soumet la phyllocyanine (à l'état de sel double combiné avec l'acétate de cuivre) à la réduction par l'iodure de phosphonium et l'acide iodhydrique, on obtient le même pyrrol, qu'à partir de l'hématine elle-même, c'est-à-dire l'hémopyrrol, pouvant s'unir également au bichlorure de mercure.

Au contraire la notion de la présence de chaînes grasses dans les deux molécules paraît devoir constituer désormais une base beaucoup plus solide pour rattacher le pigment biliaire au pigment sanguin.

En outre elle ouvre un vaste horizon sur l'importance des chaînes longues dans la constitution moléculaire des matières pigmentaires.

Dans cette voie nous avons pu isoler deux pigments dont l'étude est encore loin d'être achevée, mais que les premières recherches nous ont montré être riches en chaînes grasses.

Ce sont le pigment des caroncules de la pintade et celui du bec et des pattes de l'oie.

Le premier possède une coloration rouge-orangé magnifique, le second est d'un beau jaune serin.

Les deux se préparent, à quelques détails près, suivant la même technique.

On sait que chez la pintade les caroncules et les replis cutanés de la mandibule inférieure sont fortement colorés en rouge vif.

Il ne s'agit pas d'une coloration d'origine sanguine, due à une riche vascularisation, mais bien à un pigment spécial que l'examen histologique montre réparti dans les tissus sus-cartilagineux de la caroncule.

Les caroncules sont excisées au ciseau, puis réunies dans un cristalliseur ; (on choisira de préférence les pintades fran-

gaises, pintades de la Touraine dont les caroncules sont toujours beaucoup plus développées que celles des pintades italiennes ou du Midi; au pavillon de la volaille des Halles centrales nous avons pu en obtenir un nombre suffisant pour ces recherches). On les fait macérer pendant 12 à 24 heures dans une solution alcaline aqueuse à 15 o/o environ de soude ou de potasse. L'épiderme tout entier gonfle et se laisse facilement détacher des couches cartilagineuses sous-jacentes. On le recueille par simple repos et décantations des eaux alcalines incolores, puis on le neutralise par l'acide chlorhydrique étendue. On filtre, lave à neutralité et sèche. Un épuisement au chloroforme même à froid dissout totalement le pigment en donnant une belle liqueur orangée qui, au spectroscope en tubes longs, ne possède aucun spectre.

L'évaporation du solvant doit être faite à l'abri de la lumière, sinon il se produit très vite une décoloration complète.

Le pigment se présente sous l'aspect de croûtes orangées, onctueuses au toucher, se ramollissant à chaud en un liquide oléagineux de même coloration.

Peu soluble dans l'alcool, et surtout dans l'éther, il se dissout à froid dans l'acide acétique en donnant une liqueur orangé clair; si on abandonne cette solution à l'abri de la lumière, elle se concentre lentement en déposant des croûtes orangé brun qui, examinées au microscope, présentent un aspect cristallin très net. La liqueur acétique a légèrement verdi sans cependant avoir acquis de spectre.

Le pigment jaune du bec de l'oie s'obtient en partant des mandibules de cet oiseau. La macération en liqueur alcaline permet de détacher les parties pigmentaires mêlées à l'épiderme gonflé, gélatinisé. Après neutralisation et lavage on sèche la matière à 40°; à 110° il se produit une notable altération du pigment qui brunit.

Il est soluble dans le chloroforme en donnant une liqueur jaune sans spectre.

On le dissout à froid ou mieux à chaud dans l'acide acétique glacial, et on le laisse à l'abri de l'air; au bout de quelques

jours apparaissent des croûtes jaunâtres amorphes de pigment. La liqueur acétique se colore en vert clair; au spectroscope elle possède deux bandes nettes axe 72 et axe 113 ($\lambda = 554$).

De même que pour le pigment orangé les solutions de cette matière dans l'alcool ou le chloroforme se décolorent très rapidement à la lumière et abandonnent un dépôt huileux amorphe.

Voici donc deux pigments que nous rapprochons volontiers parce que tous les deux sont des produits d'élimination, des pigments d'ornementation localisés aux extrémités, caroncules, pattes, becs. Ils sont également solubles dans le chloroforme en particulier, dans l'alcool et l'acide acétique glacial. Ce sont des composés à fonction acide, solubles en effet, dans les alcalis caustiques et carbonatés, en liqueurs étendues, ils sont précipités par les acides en flocons qui, à chaud, se ramollissent et fondent.

Enfin tous deux se décolorent sous l'influence de la lumière soit à l'état dissous soit à l'état solide et donnent une substance onctueuse et grasse.

Ils sont azotés; la recherche de l'azote par combustion en présence de sodium (réaction de LASSAIGNE), ou par calcination avec la KOH ou la soude solide donne des résultats positifs, mais la proportion de cet élément paraît très faible autant qu'il est possible d'en juger par ces essais qualitatifs en attendant des recherches plus sérieuses.

Nous les considérons comme des types de pigments pauvres en azote.

Il y a donc deux classes de pigments dans la nature, les uns très azotés relativement et les autres très peu. Les premiers sont surtout des composés cycliques, hématine, bilirubine, etc. Chez les seconds au contraire, ce sont les chaînes longues de la série alliphatique qui dominent.

Au point de vue biologie générale, la découverte de ces chaînes dans l'hématine par M. A. VILA et nous-mêmes, et dans la bilirubine comme nous l'avons établi dans la dernière

partie de ce travail puis l'assimilation des sels biliaires, taurocholates et glycocholates avec les savons ordinaires, stéarates, oléates, au point de vue de solubilité, cristallisation, propriétés physiques, etc., enfin la présence dans le noyau cholalique d'une longue racine hydrocarburée démontrent l'importance considérable de ces chaînes longues.

Notre idée dominante en rédigeant ce long exposé de recherches expérimentales a été de mettre en lumière ce point très important et de rappeler aux savants qu'à côté des matières azotées les substances grasses occupent une place considérable et jouent dans les multiples réactions vitales un rôle de premier ordre.

PIETTRE.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE	Pages
---------	-------

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Spectroscopie</i>	3
I. Historique	3
II. Technique	6
CHAPITRE II. — <i>Spectroscopie de la bile</i>	13
Bile de l'homme, du chien, des bovidés jeunes et adultes, du porc, des poissons, des oiseaux.	14
Conclusions	20

DEUXIÈME PARTIE

Méthodes de séparation des divers éléments de la bile

Historique	28
CHAPITRE PREMIER. — <i>Technique spéciale à la bile de porc</i>	28
I. Extrait aqueux acide	29
II. — — neutre	29
III. Précipité biliaire { matières grasses	31
{ pigments	33
{ sels biliaires	33
Exemples expérimentaux	34
CHAPITRE II. — <i>Technique générale, applicable à toutes les biles</i>	37
I. Extraction des matières grasses { biles fluides	40
{ — visqueuses	41
II. Extrait sec.	43
III. « Mucines ou pseudo-mucines »	43
IV. Pigments biliaires	45
V. Sels biliaires	48
VI. Séparation des sels biliaires, historique	49
VII. Proportion d'un sel biliaire dans un mélange, méthode hydroly- tique	55
VIII. Recherches sur la séparation des sels biliaires	59
Exemples expérimentaux (biles de porc, chien, veau, bœuf, congre)	63

	Pages
CHAPITRE III. — <i>Pyrogénéation de la bile</i>	70

TROISIÈME PARTIE

Etude des acides biliaires

CHAPITRE PREMIER. — <i>Acide glycocholique</i>	75
I. Historique	75
II. Glycocholate de soude dans la bile du porc	79
III. Glycocholate de soude cristallisé	86
Exemples expérimentaux	92
IV. Acide glycocholique (porc)	93
Propriétés physiques, chimiques	94
Hydrolyse par les acides, les bases alcalines et terreuses	99
V. Essais divers	105
VI. Recherches biologiques sur le glycocholate de soude cristallisé	106
1° Toxicité, animaux supérieurs et inférieurs	106
2° Pouvoir hémolytique	111
CHAPITRE II. — <i>Taurocholates</i>	114
I. Historique	114
II. Bile de chien, saponification du taurocholate	119
III. Taurocholate cristallisé, méthode de préparation	124
Propriétés physiques, chimiques; hydrolyse acide.	129
IV. Recherches biologiques sur le taurocholate de soude cristallisé.	133
1° Toxicité; animaux supérieurs et inférieurs	133
2° Pouvoir hémolytique	140
CHAPITRE III. — <i>Acides cholaliques</i>	143
I. Historique	143
II. Acide glycocholalique	146
III. Acides taurocholaliques	149
1° Action des réducteurs. Acide hydrotaurocholalique	154
Propriétés physiques et chimiques. Exemples expérimentaux	154
2° Action des oxydants	158

QUATRIÈME PARTIE

Pigments biliaires

CHAPITRE PREMIER. — I. <i>Historique</i>	165
II. Calculs biliaires. Lithiase expérimentale	170
III. Traitement chimique des calculs. Exemples expérimentaux	175
IV. Etudes des produits pigmentaires	
d'extraction	
pigments verts	179
pigments orange-brun	181
bilirubine	184
biliflorine	185
CHAPITRE II. — <i>Relations entre les pigments orangés et les pigments verts de la bile</i>	188

	Pages
I. Réactions démontrant la présence d'une fonction acide dans la bilirubine	189
Oxydants, alcalis aqueux et alcooliques, phénols et quinones	189
II. Réactions démontrant la présence d'une fonction basique dans la bilirubine	194
Actions des halogènes, des acides halogénés, de composés chlorés divers	194
III. Analogie avec l'hématine à la fois acide et basique	198
CHAPITRE III. — <i>Recherches biologiques sur le pigment orangé de la bile</i>	200
I. Rôle décolorant histologique	200
II. Toxicité de la bilirubine	200
CHAPITRE IV. — <i>Relations chimiques entre l'hématine et la bilirubine</i>	209
Présence d'une chaîne grasse dans les deux molécules	210
Isolement de cette chaîne. Exemples expérimentaux	210
Pigments riches en azote. Pigments riches en chaînes grasses	211
Importance des chaînes longues dans les corps de la chimie biologique	221

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Influence de la lumière sur l'assimilation chlorophyllienne.

Examen spectroscopique des minéraux.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 10 mai 1910.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Paris, le 10 mai 1910.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

Pour le Vice-Recteur

L'Inspecteur d'Académie.

A. PRINGUET.

